

HELSINGIN YLIOPISTO  
Eläinlääketieteellinen tiedekunta  
Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos

## NEGATIIVISET VILJELYTULOKSET LEHMIEN UTARETULEHDUSDIAGNOSTIIKASSA



Joanna Hintukainen  
Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma  
Toukokuu 2009

Tiedekunta - Fakultet – Faculty <b>Eläinlääketieteellinen tiedekunta</b>		Laitos - Institution – Department <b>Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitos</b>	
Tekijä - Författare – Author <b>Joanna Hintukainen</b>			
Työn nimi - Arbetets titel – Title <b>Negatiiviset viljelytulokset lehmien utaretulehdusdiagnostiikassa</b>			
Oppiaine - Läroämne – Subject <b>Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito</b>			
Työn laji - Arbetets art – Level <b>Lisensiaatin tutkielma</b>		Aika - Datum – Month and year <b>Kevät 2009</b>	Sivumäärä - Sidoantal – Number of pages <b>41</b>
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p>Utaretulehdus on lypsylehmillä yleisin ja taloudellisesti merkittävin sairaus. Sen aiheuttaa tavallisesti bakteeri-infektio. Perusmenetelmänä utaretulehduksen aiheuttajakbakteerin eristämässä ja tunnistamisessa on toistaiseksi ollut maidonäytteen viljely. Yli neljäsosassa viljelyistä näytteistä ei kuitenkaan havaita kasvua. Negatiiviset viljelytulokset ovat ongelmallisia ja turhauttavia sekä tuottajien, eläinlääkärien, että laboratorioden kannalta. Aikaa ja rahaa kuluu hukkaan, työ määrä lisääntyy ja utaretulehdusten hoitojen sekä ennaltaehkäisyn suunnittelu vaikeutuu.</p> <p>Negatiivisia viljelytuloksia saadaan sekä subkliinisistä eli piilevistä utaretulehdustapauksista että kliinisistä utaretulehdustapauksista otetuista näytteistä. Subkliiniset utaretulehdukset todetaan jonkin tulehdusta kuvaavan testin avulla. Tällainen on esimerkiksi tilatasolla käytössä oleva, maidon solujen määrään perustuva, puhekielessä lettupannutestiksi kutsuttu California mastitis test (CMT) –testi. Kliinistä utaretulehdusta sairastavilla lehmillä on aina näkyviä oireita.</p> <p>Negatiivinen viljelytulos voi johtua useista tekijöistä. Maidossa on bakteereja tappavia ja niiden kasvua estäviä tekijöitä. Maidonäytteen käsittely ja säilytys sekä näytteeseen joutuneet antibiootti- tai kemikaalijäämät voivat estää bakteerien kasvua. Joillakin bakteereilla on tyypillisiä ominaisuuksia, joiden takia ne ovat ongelmallisia viljelyyn perustuvassa diagnostiikassa. Infektion spontaani paraneminen on yksi mahdollinen syy sille, että näytteestä ei enää kasva bakteereita.</p> <p>Tässä tutkimuksessa pyrittiin polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuvaa menetelmää käyttäen selvittämään, löytyykö kliinisistä utaretulehdustapauksista otetuista, mutta viljelyssä negatiivisista näytteistä utaretulehdusbakteerien DNA:ta ja jos, niin minkä bakteerien. Tutkittavia näytteitä oli 79. Käytetty menetelmä tunnistaa 11 bakteeria tai bakteeriryhmää, jotka ovat esiintymistä kartoittavien tutkimusten perusteella yleisimpiä utaretulehduksen aiheuttajia. Menetelmä tunnistaa myös stafylokokkien penisilliiniresistenssiä koodaavan <math>\beta</math>-laktamaasigeenin. Lähes puolesta tutkituista näytteistä löytyi tavallisimpien utaretulehdusbakteerien DNA:ta.</p> <p>Tutkimuksen perusteella voidaan todeta, että PCR:ään perustuvalla diagnostiikalla saadaan taudinaiheuttaja selville myös useissa tapauksissa, joissa viljelytulos on negatiivinen. Tällä hetkellä näytteiden tutkiminen on PCR:llä kalliimpaa kuin viljelyllä. PCR-menetelmä voisi olla taloudellisesti kannattava ainakin sellaisissa tapauksissa, joissa on syytä epäillä bakteerien kasvun estyvän. Sitä voi suositella myös sellaisissa tapauksissa, joissa negatiivisen viljelytuloksen saaminen olisi erityisen turhauttavaa tai tieto aiheuttajakbakteerista halutaan saada nopeasti.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords <b>lehmä, utaretulehdus, mastiitti, viljely, ei kasvua, PCR, diagnostiikka</b>			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited <b>Viikin tiedekirjasto</b>			
Työn valvoja (professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) Työn johtaja: Prof. Satu Pyörälä Työn ohjaajat: ELL Heli Simojoki, ELT Suvi Taponen			

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1</b>	<b>JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>KIRJALLISUUSKATSAUS .....</b>	<b>2</b>
2.1	Kliininen ja subkliininen utaretulehdus .....	2
2.2	Utaretulehdusbakteerien jaottelu .....	2
2.3	Utaretulehduksen kuvaajat .....	3
2.3.1	Soluluku .....	3
2.3.2	Muut utaretulehduksen kuvaajat .....	5
2.4	Utaretulehdusten esiintyminen .....	5
2.4.1	Taudinaiheuttajat kliinisessä utaretulehduksessa .....	6
2.4.2	Taudinaiheuttajat todetuissa subkliinisissä utaretulehduksissa .....	7
2.5	Utaretulehdusbakteerien ominaispiirteiden vaikutus niiden toteamiseen viljelyn avulla .....	8
2.5.1	<i>S. aureus</i> -infektion ominaispiirteitä .....	8
2.5.2	Koliiformien aiheuttamien infektioiden ominaispiirteitä .....	9
2.5.3	Anaerobit .....	10
2.5.4	<i>Mycoplasma (M.) bovis</i> .....	10
2.6	Näytteenoton, kuljetuksen ja säilytyksen vaikutus bakteerien kasvuun .....	11
2.7	Maidossa olevien tekijöiden vaikutus bakteerien kasvuun .....	12
2.7.1	Vedinkanavan keratiinin rasvahapot .....	13
2.7.2	Rautaa sitovat proteiinit maidossa .....	14
2.7.3	Muita antimikrobisia proteiineja .....	14
2.7.4	Immuunipuolustuksen solut maidossa .....	15
2.8	Viljely .....	16
2.9	Viljelytuloksen parantaminen näytteen esikäsittelyjen ja näytemäärän lisäämisen avulla .....	17
2.9.1	Pakastaminen .....	17
2.9.2	Maidon inkubaatio ennen viljelyä ja maitomäärä .....	18
2.10	Viljelylle vaihtoehtoiset menetelmät diagnostiikassa .....	19
2.10.1	PCR:n lähtökohdat utaretulehdusdiagnostiikassa .....	19
2.10.2	Utaretulehdusbakteerien DNA:n monistus PCR:llä maitonäytteestä .....	20
2.10.3	Utaretulehdusbakteerien tunnistus maidosta kvantitatiivisellä PCR:llä .....	21
2.10.4	PCR:n mahdollisuuksia utaretulehdusdiagnostiikassa .....	22
2.10.5	ELISA .....	23
<b>3</b>	<b>TUTKIMUSOSA .....</b>	<b>24</b>
3.1	Aineisto ja menetelmät .....	24
3.1.1	Näytteet ja taustatiedot .....	24
3.1.2	Tutkimuksen kulku .....	25
3.2	Tulokset .....	26
3.3	Pohdinta .....	29
	<b>KIITOKSET .....</b>	<b>32</b>
	<b>LÄHDELUETTELO .....</b>	<b>33</b>
	<b>LIITE .....</b>	<b>41</b>

# 1 JOHDANTO

Utare tulehdus on yleisin ja taloudellisesti merkittävin sairaus lypsylehmillä (Seegers ym. 2003). Tavallisesti sen aiheuttaa bakteeri-infektio. Utare tulehdusten diagnostiikassa, eli taudinaiheuttajan toteamisessa ja tunnistamisessa, on vakiintunut perusmenetelmäksi mikrobiviljely, joka tehdään maitonäytteestä elatusainemaljalle. Mikrobikasvua ei kuitenkaan todeta viljelyn avulla noin neljäsosassa sellaisista näytteistä, jotka on otettu kliinistä utare tulehdusta sairastavalta lehmältä. Subkliinisissä eli piilevissä utare tulehdustapauksissa negatiiviset viljelytulokset ovat vieläkin yleisempiä. Koska utare tulehdukset vaativat erilaisia hoitokäytäntöjä taudinaiheuttajasta riippuen, negatiiviset, eli ”ei kasvua” -viljelytulokset vaikeuttavat sekä utare tulehdusten ennaltaehkäisyä karjatasolla että lehmäkohtaista hoitojen suunnittelua.

Siitä, miksi negatiivisia viljelytuloksia saadaan utare tulehdustapauksissa otetuista maitonäytteistä ja siitä, mitä bakteereja on näiden tulehdusten aiheuttajina, on erilaisia oletuksia. Jotta taudinaiheuttajien tunnistaminen paranisi, viljelyn herkkyyttä on pyritty parantamaan erilaisin apukeinoin. Näiden apukeinojen pyrkimyksenä on lisätä näytteessä olevien kasvukykyisten bakteerien määrää. Vaikka taudinaiheuttajien tunnistaminen on joissain tapauksissa parantunut, nämä apukeinot eivät kuitenkaan tarjoa ratkaisua negatiivisista viljelytuloksista aiheutuvaan ongelmaan. Bakteerien toteamiseen maitonäytteestä on kehitetty myös viljelylle vaihtoehtoisia menetelmiä. Polymeerasiketjureaktioon (PCR) perustuvaa menetelmää käyttäen on saatu erittäin lupaavia tuloksia.

Kirjallisuuskatsauksessa käsitellään utare tulehdusten ilmenemistä ja taudinaiheuttajien yleisyyttä, erilaisia diagnostiikkaan vaikuttavia tekijöitä sekä diagnostiikassa käytettyjä menetelmiä. Tutkimuksessa pyrittiin reaaliaikaista PCR:ää käyttäen selvittämään, esiintyykö myös viljelyssä negatiivisissa näytteissä taudinaiheuttajia ja jos, niin mitä. Tutkittavia näytteitä oli 79 ja niistä pyrittiin tunnistamaan yhdentoista yleisimmän bakteerin tai bakteeriryhmän DNA:ta. Käytetty menetelmä tunnistaa kohtalaisen pienen määrän tunnistettavaksi valittujen bakteerien DNA:ta. Bakteerien kasvun estymisellä ei ole vaikutusta diagnostiikkaan ja menetelmä tunnistaa kuolleetkin bakteerit.

## 2 KIRJALLISUUSKATSAUS

### 2.1 Kliininen ja subkliininen utaretulehdus

Utaretulehdus on mistä tahansa syystä johtuva lehmän maitorauhasen parenkyymin, eli peruskudoksen tulehdus (Radostits ym. 2007). Lähes aina syynä on infektion aiheuttava mikrobi (IDF, 1999). Se aiheuttaa maidon koostumukseen monia muutoksia, joita voidaan käyttää diagnoosin tekemisen apuna (Pyörälä 2003). Utaretulehdukset jaetaan kliinisiin ja subkliinisiin eli piileviin tulehduksiin sen mukaan, onko niissä näkyviä oireita vai ei. Kliinisissä tapauksissa oireita, joista lehmällä esiintyy aina joko yhtä tai useampaa, ovat näkyvät muutokset maidon koostumuksessa, tulehduksen merkit utareessa ja yleisoireet (Radostits ym. 2007). Subkliiniset tulehdukset voidaan todeta ainoastaan käyttämällä tarkoitukseen sopivia testejä. International Dairy Federationin (IDF) suositusten mukaan diagnoosi perustetaan neljänneksen solulukuun ja mikrobiologiseen statukseen (Pyörälä 2003).

### 2.2 Utaretulehdusbakteerien jaottelu

Osa utaretulehdusbakteereista luokitellaan tartunnallisiin ja osa ympäristöperäisiin (Radostits ym. 2007). *S. aureus* ja *Str. agalactiae* pidetään tyypillisinä tartunnallisten, eli lehmästä toiseen tarttuvien utaretulehdusten aiheuttajina. Koliformit taas ovat tyypillisiä ympäristöperäisiä, eli normaalisti ympäristössä eläviä, mutta mahdollisesti utareen infektoivia ja tulehdusta aiheuttavia bakteereja.

Utaretulehdusbakteerit jaotellaan myös merkittäviin ja vähäpätöisiin taudinaiheuttajiin sen perusteella, kuinka voimakkaita tulehdusreaktioita ne aiheuttavat (Østerås ym. 2005; Sampimon ym. 2008; Schepers ym. 1997; Bradley ym. 2007). Merkittäviksi taudinaiheuttajiksi luetaan *S. aureus*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis*, *E. coli* ja *Str. agalactiae*. Vähäpätöisiksi taudinaiheuttajiksi luetaan muut bakteerit, lähinnä KNS ja *C. bovis*. Vähäpätöiset bakteerit aiheuttavat pääsääntöisesti vain lievän tulehdusreaktion (Djabri ym. 2002; Schepers ym. 1997).

## 2.3 Utaretulehduksen kuvaajat

### 2.3.1 Soluluku

Maidossa olevien somaattisten solujen laskettu määrä eli soluluku on maailmanlaajuisesti yleisimmin utaretulehduksen toteamisessa käytetty mitattava ominaisuus. Se on käyttökelpoinen kuvaaja utareen terveydelle ja maidon laadulle (Schukken ym. 2003). Suurin osa maidossa esiintyvistä soluista on leukosyyttejä (Rainard & Riollet 2006; Sordillo ym. 1997).

Utaretulehduksia pyritään havaitsemaan somaattisten solujen esiintymisen avulla sekä tilatasolla että laboratorioon lähetetyistä näytteistä. Tilatasolla subkliiniset utaretulehdukset todetaan yleensä California mastitis test (CMT) -testin avulla visuaalisesti. Testiaine reagoi solujen DNA:n kanssa, jolloin tulos nähdään hyytelöitymisen voimakkuuden perusteella. Joissain CMT-testiaineissa on mukana pH-indikaattori, jolloin näytteen ja testiaineen muodostaman geelin väri määräytyy maidon happamuuden mukaan. Tulehtuneen utareneljänneksen maito on hieman emäksisempää kuin terveen neljänneksen maito (Sandholm 1995). CMT-testi on helppokäyttöinen ja hyödyllinen subkliinisten tulehdusten tunnistamisessa, mutta sen avulla saadaan vain arvio soluluvusta. Laboratorioissa solut lasketaan yksitellen värjätystä näytteestä, tai useimmiten käytetään automaattisia solulaskureita, jolloin tulos on huomattavasti tarkempi (Gonzalo ym. 2003).

Tulehdus on kudoksen reaktio johonkin sitä ärsyttävään tekijään. Näitä voivat olla patogeeneit, kemikaalit sekä mekaaniset tai lämpötilasta johtuvat vauriot. Myös autoimmuunireaktiot voivat aiheuttaa tulehduksen. Tulehdus on monimutkainen prosessi, jossa on osallisena monia tekijöitä. Tärkeimpiä näistä ovat plasman proteiinit, kudoksen solut, leukosyytit sekä erilaiset välittäjäaineet (Ringler 1997). Maidon immuunipuolustussolut ovat siis osa kudosaärsytyksen aiheuttamaa tulehdusreaktiota. Sen lisäksi, että tulehdus voi johtua kudosaivurioista tai kudostuhosta, se myös aiheuttaa kudosaivurioita. Tulehduksen päämäärä on kuitenkin kudoksen parantuminen. Koska

utaretulehdukset ovat tavallisesti jonkin mikrobin aiheuttamia, infektioiden ja soluluvun välillä on selvä verrannollisuus.

Tulehdusreaktio voi olla enemmän tai vähemmän voimakas. Muiden seikkojen ohella tähän vaikuttaa tulehduksen aiheuttanut bakteerilaji. Patogeenien vaikutusta kartoittavassa meta-analyysissä todettiin, että infektoitumattomien neljännesten keskimääräinen soluluku oli 68 000 solua/ml (Djabri ym. 2002). Infektoituneiden neljännesten soluluvut olivat korkeammat kuin infektoitumattomien. Vähäpätöisten patogeenien aiheuttamissa infektioissa soluluku oli selvästi alhaisempi kuin merkittävien aiheuttamissa.

Infektio on merkittävin solulukuun vaikuttava tekijä, mutta useilla muillakin tekijöillä on havaittu olevan yhteyttä solulukuihin (Schepers ym. 1997; Harmon ym. 1994; Skrzypek ym. 2004). Suurissa karjoissa soluluvut ovat olleet lievästi korkeampia kuin pienissä (Skrzypek ym. 2004) ja vähäistä verrannollisuutta on myös poikimakerralla (Schepers ym. 1997). Kesäisin soluluvut ovat keskimääräistä korkeammat (Green ym. 2006; Skrzypek ym. 2004; Olde Riekerink ym. 2007a). Näytteenottoaika voi vaikuttaa tulokseen niin, että lypsyn jälkeen solut ovat enemmän koholla kuin ennen lypsä (Olde Riekerink ym. 2007b). Maitotuotoksella on solupitoisuuden merkittävä vaikutus (Green ym. 2006). Jos tuotos on korkea, solujen pitoisuus laimentuu. Matalatuotoksisella lehmällä solujen konsentraatio maidossa on suurempi. Lypsykauden vaihe on maidon solupitoisuuden kannalta merkittävä asia (Schepers ym. 1997). Poikimisen aikaan ja noin viikon sen jälkeen solupitoisuus on huomattavan korkea (Rainard & Riollot 2006).

Yleensä lehmän kokomaidon soluluku ei ylitä arvoa 200 000 solua/ml, jos lehmällä ei ole utareinfektiota (Schukken ym. 2003; Schepers ym. 1997; Hogan ym. 1999). Suomalaisissa kattavissa utaretulehdusten esiintyvyyttä kartoittavissa tutkimuksissa on soluluvun raja-arvona utaretulehduksille käytetty 300 000 solua/ml (Myllys ym. 1998; Pitkälä ym. 2004). Kuten Pitkälä ym. (2004) toteavat, näin korkean raja-arvon herkkyyys on kyseenalainen. Yleisesti sovittua raja-arvoa utaretulehduksille ei ole, mutta infektion todennäköisyys kasvaa soluluvun noustessa.

### 2.3.2 Muut utaretulehduksen kuvaajat

Muidenkin kuvaajien kuin soluluvun soveltuvuutta utaretulehdusten esiintymisen ja voimakkuuden arviointiin on tutkittu. Tällaisia kuvaajia ovat muun muassa maidon N-asetyyli- $\beta$ -D-glukosaminidaasi (NAGaasi) -aktiivisuus, lehmän seerumin albumiini, maidon antitrypsiini ja sähkönjohtavuus (Kitchen ym. 1980; Mattila 1985).

NAGaasi on lysosomaalinen entsyymi, joka vapautuu soluista kudostuhon yhteydessä. Maidon NAGaasi on peräisin pääosin maitorauhaskudoksen epiteelisoluista (Kitchen ym. 1980). Sen aktiivisuus maidossa kertoo kudostuhon voimakkuudesta, mutta heijastaa myös solujen määrää. NAGaasi-aktiivisuus korreloi hyvin soluluvun kanssa, mutta kertoo ehkä paremmin kudostuhon asteesta kuin soluluvusta, johon muillakin tekijöillä voi olla vaikutusta (Mattila 1985).

## 2.4 Utaretulehdusten esiintyminen

Viime vuosikymmeninä utaretulehdusten esiintymisessä ja aiheuttajabakteerien keskinäisissä suhteissa on tapahtunut muutoksia sekä Suomessa että muualla maailmassa. Nähtävissä on ollut subkliinisten utaretulehdusten vähentymistä sekä tankkimaidon solulukujen laskua (Myllys ym. 1998; Pitkälä ym. 2004; Sampimon ym. 2008; Østerås ym. 2005). Tyypillisten tartunnallisten utaretulehdusbakteerien esiintyminen on vähentynyt, kun taas lievempiä tulehduksia aiheuttavat bakteerit ovat yleistyneet (Myllys ym. 1998; Pitkälä ym. 2004; Sampimon ym. 2008; Makovec & Ruegg 2003).

Suomessa utaretulehdusten esiintyvyys oli vuonna 2001 tehdyn tutkimuksen mukaan karjoissa keskimäärin 30,6 % (Pitkälä ym. 2004). Niiden tulehdusten määrä, jotka ovat nostaneet soluluvun yli 300 000 soluun/ml, on laskenut jatkuvasti vuodesta 1988 (Myllys ym. 1998; Pitkälä ym. 2004). Bakteriologisesti positiivisten utareneljännesten määrä taas on noussut. Erityisesti *Corynebacterium* (C.) *boviksen* osuus on noussut Suomessa viime vuosina, *Staphylococcus* (S.) *aureuksen* osuus sen sijaan on laskenut (Myllys ym. 1998; Pitkälä ym. 2004).



Suomessa yleisimpiä utareinfektioiden aiheuttajia ovat olleet pitkään koagulaasinegatiiviset stafylokokit (KNS) (Myllys ym. 1998; Pitkälä ym. 2004). Vuonna 2001 toiseksi yleisin aiheuttaja oli *C. bovis*, jonka jälkeen yleisin oli *S. aureus* (Pitkälä ym. 2004). KNS on yleinen infektioiden aiheuttaja myös muualla maailmassa (Macovec & Ruegg 2003; Østerås ym. 2005). Norjalaisessa kartoitustutkimuksessa *S. aureus* todettiin kuitenkin yleisimmäksi utaretulehduksen aiheuttajaksi (Østerås ym. 2005). *C. bovis* ei ole kattavissa kartoitustutkimuksissa todettu yhtä yleiseksi muualla kuin Suomessa.

#### 2.4.1 Taudinaiheuttajat kliinisessä utaretulehduksessa

Yleisimmät kliinisiä utaretulehduksia aiheuttavat bakteerit ja niiden osuudet taudinaiheuttajista vaihtelevat jonkin verran alueittain. Suomessa yleisimpiä ovat olleet *S. aureus*, KNS ja *Streptococcus (Str.) uberis* (Koivula ym. 2007). Monilla alueilla eri puolilla maailmaa yleisimpien joukossa ovat viimeisen vuosikymmenen aikana olleet *S. aureus*, *Escherichia (E.) coli* ja KNS (Koivula ym. 2007; Ericsson Unnerstad ym. 2008; Bradley ym. 2007; Giannechini ym. 2002). Lisäksi huomattavia aiheuttajia ovat olleet *Str. uberis* ja *Str. dysgalactiae* (Koivula ym. 2007; Ericsson Unnerstad ym. 2008; Bradley ym. 2007). Joillain alueilla yleisimpiin kliinisen utaretulehduksen aiheuttajiin ovat lukeutuneet myös *Arcanobacterium (A.) pyogenes* ja *Klebsiella spp.* (Ericsson Unnerstad ym. 2008), sekä *Corynebacterium spp.* (Bradley ym. 2007). Näiden lisäksi kliinisiä tulehduksia ovat aiheuttaneet *Str. agalactiae* ja *Enterococcus spp.* (Koivula ym. 2007; Giannechini ym. 2002). Joissain harvoissa tapauksissa taudinaiheuttajina ovat olleet myös *Bacillus spp.*, hiivat ja *Proteus spp.* sekä jotkin muut utaretulehduksissa harvinaisemmat mikrobit (Ericsson Unnerstad ym. 2008; Bradley ym. 2007).

Taudinaiheuttaja jää tunnistamatta noin 25 %:ssa kliinisistä utaretulehduksista, koska viljelyssä ei todeta bakteerikasvua (Nevala ym. 2004; Koivula ym. 2007; Bradley ym. 2007). Suomalaisissa tutkimuksissa osuudet ovat olleet 23,7 % (Koivula ym. 2007) ja 27,1 % (Nevala ym. 2004). Yhdistyneessä kuningaskunnassa (UK) tehdyssä tutkimuksessa osuus oli 26,5 % (Bradley ym. 2007). Negatiivisten viljelytuloksien

osuuksissa on huomattavaakin vaihtelua eri tutkimuksien kesken. Ruotsalaistutkimuksessa ”ei kasvua” -tuloksia oli vain 10,6 % (Ericsson Unnerstad ym. 2008), kun taas Kanadassa tehdyssä tutkimuksessa kasvua ei todettu 43,9 %:ssa kliinisistä utaretulehdustapauksista (Olde Riekerink ym. 2008). Perusteet, joilla tutkimuksiin valitut tapaukset on otettu mukaan, voivat muiden tekijöiden ohella vaikuttaa osuuksiin.

#### 2.4.2 Taudinaiheuttajat todetuissa subkliinisissä utaretulehduksissa

Subkliinisissä utaretulehduksissa yleisin taudinaiheuttaja on ollut KNS (Koivula ym. 2007; Bradley ym. 2007; Sampimon ym. 2008). Myös *S. aureus* on subkliinisten utaretulehdusten aiheuttajana yleinen, sen esiintyvyys tosin vaihtelee melko paljon alueittain (Koivula ym. 2007; Bradley ym. 2007; Sampimon ym. 2008; Gianneechini ym. 2002). Suomessa *S. aureus* on kohtalaisen yleinen (Koivula ym. 2007). Muita yleisiä subkliinisten utaretulehdusten aiheuttajia ovat *Str. uberis*, *Corynebacterium spp.*, *Str. dysgalactiae* ja *Bacillus spp.* (Koivula ym. 2007; Bradley ym. 2007; Sampimon ym. 2008). Subkliinisten tulehdusten aiheuttajana on lisäksi esiintynyt *Str. agalactiae*, *Enterococcus spp.* ja *E. coli* (Koivula ym. 2007; Gianneechini ym. 2002) sekä esimerkiksi hiivat, *Serratia spp.* ja *Proteus spp.* (Bradley ym. 2007).

Subkliinisissä utaretulehdustapauksissa ”ei kasvua” -tulokset ovat keskimäärin yleisempiä, kuin kliinisissä tapauksissa. Noin 40 %:ssa tapauksista viljelyssä ei todeta bakteerikasvua (Bradley ym. 2007; Koivula ym. 2007; Gianneechini ym. 2002). Suomessa tehdyssä tutkimuksessa negatiivisten viljelytulosten osuus oli 28,7 % (Koivula ym. 2007), UK:ssa 38,6 % (Bradley ym. 2007) ja Uruguayssa 55,1 % (Gianneechini ym. 2002). Subkliinisten utaretulehdustapausten ”ei kasvua” -tuloksia on raportoitu melko vähän tutkimusten kysymyksenasetteluista johtuen.

## 2.5 Utaretulehdusbakteenien ominaispiirteiden vaikutus niiden toteamiseen viljelyn avulla

Seuraavissa kappaleissa käsitellään tiettyjä viljelyn kannalta hankalia tai ongelmallisiksi epäiltyjä taudinaiheuttajia. Ongelmia voivat aiheuttaa joko taudinaiheuttajien vähäinen erittyminen tai erityiset kasvuvaatimukset. *S. aureus* ja koliformit ovat tavallisia taudinaiheuttajia, joita saattaa tietyissä infektion vaiheissa erittyä hyvin pieniä määriä. Erityisiä kasvuolosuhteita vaativia bakteereja ei juuri esiinny Suomessa yksin utaretulehduksen taudinaiheuttajana.

### 2.5.1 *S. aureus* -infektion ominaispiirteitä

*S. aureus* on merkittävä ja tartunnallinen utaretulehdusbakteeri. Se aiheuttaa usein kliinisiä utaretulehduksia, joiden oireet voivat olla hyvin voimakkaat. Vielä useammin se kuitenkin aiheuttaa subkliinisiä utaretulehduksia, jotka kroonistuvat helposti. Hoitotulokset antibiootilla ovat huonoja, etenkin, jos bakteerikanta on penisilliiniresistentti. Suomessa noin puolet *S. aureus*-kannoista on penisilliinille resistenttejä (Pitkälä ym. 2004). Kroonisissa utaretulehduksissa bakteerit ovat maitorauhasen epiteelisolujen sisällä tai maidossa olevissa neutrofiileissa ja makrofageissa, joiden sisällä ne, toisin kuin monet muut bakteerit, voivat säilyä elävinä (Pyörälä 1995). Vaikka kroonistuminen on tyypillistä, *S. aureus* -infektion spontaanikin paraneminen on mahdollista (Adams ym. 1992).

Krooniselle *S. aureus*-infektioille on tyypillistä vaihteleva kausittainen bakteerieritys. Kausittaisessa bakteerierityksessä erityshuiput ja vähäisen erittymisen vaiheet vuorottelevat. Kun eritys on vähäistä, 10 mikrolitran viljelyotokseen ei välttämättä satu bakteereja, jolloin *S. aureus*-kasvua ei saada esiin. Infektioissa voidaan erottaa myös erilaisia eritysmalleja (Sears ym. 1990). Joissain infektioiden keskimääräinen eritystaso on huomattavasti korkeampi kuin toisissa. Bakteerien syklisen esiintymisen takia useammat näytteenotokerrat lisäävät oikean diagnoosin todennäköisyyttä. Sears ym. (1990) tutkivat *S. aureuksen* erittymistä 28 vuorokauden ajan, näytteet otettiin aamuin

illoin. Lehmät oli infektoitu kokeellisesti tutkimusta varten. Eritysmallia tutkittiin myös luonnollisissa infektioissa. Tutkimuksessa erotettiin kaksi erilaista erittymismallia: matala ja korkea. Matalaan eritysmalliin luettiin ne tapaukset, joissa bakteerien pitoisuus oli näytteissä keskimäärin alle 1000 pesäkettä muodostavaa yksikköä (pmy)/ml ja korkeaan ne, joissa bakteerien pitoisuus oli keskimäärin yli 2000 pmy/ml. Kummassakin mallissa erityksen määrä vaihteli kausittain. Yksittäisen näytteenoton herkkyys infektion tunnistamisessa oli 74,5 % ( $\pm 16,75$ ), kahden näytteenottokerran herkkyys 94 % ja kolmen kerran 98 %.

### 2.5.2 Koliformien aiheuttamien infektioiden ominaispiirteitä

Koliformit ovat ympäristöperäisiä utaretulehdusbakteereja, jotka joutuvat utareen maitotilaan ulosteperäisesti kontaminoituneesta ympäristöstä joko avoimen vedinkanavan kautta tai vaurion seurauksena. Utaretulehduksista puhuttaessa koliformeilla tarkoitetaan *E.coli*-lajiin ja *Klebsiella*-sukuun kuuluvia bakteereja sekä *Enterobacter aerogenes*tä. (Radostits ym. 2007). Noin 85 % koliformiutaretulehduksista on *E. coli* -bakteerien aiheuttamia (Sandholm & Pyörälä 1995).

Koliformit eivät selviydy normaalisti utareen maitotilassa pitkiä aikoja. Suurin osa *E. colin* aiheuttamista infektioista on kestoaltaan alle 10 päivää (Hogan ym. 1999) ja lyhyempiä kuin *Klebsiellan* aiheuttamat (Smith ym. 1985). Spontaani paraneminen on tavallista. Koliformisten bakteerien aiheuttamien infektioiden loppuvaiheessa maidossa on bakteereita usein alle 100 pmy/ml, mikä vaikeuttaa bakteerien eristämistä (Hogan & Smith 2002). Tämän takia näyte tulisi ottaa infektion alkuvaiheessa. Vaikka bakteeria ei infektion loppuvaiheessa olisi enää todettavissa, oireet voivat kuitenkin olla huomattavat. Äkillisessä *E. colin* aiheuttamassa tulehduksessa esiintyvät rajut oireet johtuvat endotoksiinien suorista vaikutuksista ja lehmän elimistön vasteesta näihin bakteereista vapautuviin myrkkyihin (Burvenich ym. 2003). Bakteerien häviämisen jälkeen tulehduksen kuvaajat kertovat vielä joidenkin päivien ajan kudoksen reaktiosta (Suojala ym. 2008).

### 2.5.3 Anaerobit

Perusmenetelmän mukainen viljely tapahtuu aerobisissa olosuhteissa, joissa anaerobiset bakteerit eivät kasva (EVIRA 2009a). Rutiinitutkimuksessa anaerobisia tulehduksenaiheuttajia ei pyritäkään eristämään. Anaerobisia taudinaiheuttajia on kuitenkin mukana ainakin niin kutsutussa kesämastiitissa, joka on tiettyjen aerobisten ja anaerobisten bakteerien aiheuttama sekainfektio utareessa (Pyörälä ym. 1992). Kesämastiittia esiintyy tyypillisesti kesäisin ummessa olevilla lehmillä ja hiehoilla. *Peptostreptococcus (P.) indolicus* ja *Fusobacterium necrophorum* ovat tyypillisiä mukana olevia anaerobisia bakteereja, lisäksi infektiosta on eristetty *Bacteroides*-lajeihin kuuluvia ja muita anaerobisia gram-negatiivisia sauvoja (Pyörälä ym. 1992; Jousimies-Somer ym. 1996). Diagnoosi tehdään usein mikroaerofiilisen *A. pyogeneksen* eristämisen ja oireiden perusteella, sillä pelkän bakteriologian perusteella kesämastiittia on vaikea määrittää.

Näiden sekainfektioiden lisäksi *Clostridium perfringens* tyyppi A:n aiheuttamia utaretulehdustapauksia on raportoitu (Schoonderwoerd ym. 1990; Radostits ym. 2007). Nämä tapaukset ovat harvinaisia, mutta esiintyessään oireiltaan hyvin tyypillisiä. Voimakkaiden yleisoireiden lisäksi paikallisoireina esiintyy infektoituneen utareneljänneksen turvotusta ja punoitusta joka etenee kuolioksi, sekä ihonalaista kaasunmuodostusta. Voimakkaiden oireiden takia todennäköisyys sille, että anaerobit muodostaisivat käytännössä diagnostisen ongelman, on pieni.

### 2.5.4 *Mycoplasma (M.) bovis*

Naudoissa esiintyvät mykoplasmat ovat pääosin pöytävieraita (kommensaaleja), mutta jotkin lajit aiheuttavat myös vakavia infektoita (Songer & Post 2005). Mykoplasmat ovat soluseinättöminä erittäin riippuvaisia isäntäsoluista. *M. bovis* voi kulkeutua verenkierrassa aiheuttaen niveltulehdusta ja aivokalvontulehdusta. Lisäksi se aiheuttaa paikallisia tulehduksia, kuten utaretulehdusta.

*M. bovis* on tavattu utaretulehduksen aiheuttajana muun muassa Yhdysvaltojen, Kanadan, UK:n, Israelin ja Australian alueilla (Radostits ym. 2007; Ghadersohi ym. 1999; van der Burgt ym. 2008). Se on tartunnallinen, merkittävä ja joillain alueilla yleinen (González & Wilson 2003; Ghadersohi ym. 1999). *M. bovis* aiheuttamat oireet ovat usein voimakkaat (van der Burgt ym. 2008; González & Wilson 2003). Suomessa *M. bovis* ei ole todettu vuoteen 2007 mennessä (EVIRA 2009b).

*M. bovis*in diagnosointi viljelemällä on hankalaa, sillä se ei kasva utaretulehdusbakteerien eristämiseen normaalisti käytettävässä viljelyssä eli aerobisesti inkuboidulla veriagarilla (Hogan ym. 1999). Se on erittäin hidaskasvuinen ja vaatii erityisiä olosuhteita kasvaakseen. Normaalisti kasvuun elatusalustalla kuluu 4-5 päivää (Songer & Post 2005), mutta negatiivinen diagnoosi voidaan tehdä vasta 7-10 päivän kuluttua (Hogan ym. 1999). Näyte tulisi ottaa varhaisessa vaiheessa infektiota (Songer & Post 2005), säilyttää viileässä kuljetuksen ajan ja viljellä muutaman tunnin kuluessa. Jos viljely voidaan suorittaa vasta yli vuorokauden kuluttua, tulisi näyte jäädyttää tai säilöä nestetypessä (Hogan ym. 1999). Kasvatusalustassa tulisi olla muun muassa steroleja, vitamiineja, aminohappoja ja pH:n tulisi olla 7,3-7,8 (Songer & Post 2005). Inkuboinnin tulisi tapahtua 37 °C lämpötilassa, kosteassa ja 10 % hiilidioksidipitoisuudessa (Hogan ym. 1999). Tulosten tulkintaa häiritsevän kilpailun estämiseksi kontaminanttien kasvun esto on tarpeen (Songer & Post 2005).

Erityisistä kasvuvaatimuksista johtuen *M. bovis* on tutkittava näytteistä erikseen soveltuvalla menetelmällä, jos sen esiintymistä halutaan kartoittaa. Useimmissa kartoitustutkimuksissa on kuitenkin käytetty ainoastaan perusmenetelmää mikrobien osuuksien selvittämiseen.

## **2.6 Näytteenoton, kuljetuksen ja säilytyksen vaikutus bakteerien kasvuun**

Utaretulehdusta tutkittaessa monilla tekijöillä ennen viljelyä on vaikutusta diagnostiikan luotettavuuteen. Tällaisia tekijöitä ovat esimerkiksi näytteenottoajankohta, näytteenottotekniikka, näytteen säilytysaika ja -lämpötila. Niiden vaikutus on otettava huomioon, jotta saadaan edustava näyte viljeltäväksi.

Godden ym. tutkivat näytteenottoajankohdan vaikutusta *S. aureuksen* diagnosointiin. Ennen lypsyä otetuista näytteistä bakteereja saadaan kasvamaan tunnistukseen riittäviä määriä useammin kuin lypsyn jälkeen otetuissa (Godden ym. 2002). Tosin on myös havaittu, että lypsyn jälkeen otetuissa näytteissä herkkyys olisi parempi (Sears ym. 1991). Syyksi on ehdotettu sitä, että maito on huuhdellut kontaminaation aiheuttajat vedinkanavasta. Maitonäyte ei ole koskaan steriili, mutta hyvän näytteenottotekniikan avulla kontaminaation määrää voidaan vähentää huomattavasti. Aseptinen näytteenottotekniikka on onnistuneelle diagnostiikalle ehdoton edellytys (Hogan ym. 1999). Yhtä tärkeitä ovat näytteen käsittely ja säilytys.

Jotta näyte säilyisi viljelyyn asti mahdollisimman samankaltaisena kuin se oli näytteenottohetkellä, näytteet tulisi jäähdyttää välittömästi ottamisen jälkeen ja säilyttää kuljetuksen ajan jäillä tai jääkaapissa (Hogan ym. 1999). Jos näytettä ei voida viljellä 24-48 tunnin kuluessa, se pitäisi pakastaa välittömästi näytteenoton jälkeen. Suurin osa utaretulehduksen aiheuttajista selviytyy jääkaappilämpötilassa useita päiviä ja pakastettuna useita viikkoja (Hogan ym. 1999). Jotkin mikrobit saattavat kuolla pitkittyneen säilytyksen aikana. Pakastamisella on todettu negatiivista vaikutusta ainakin koliformisten bakteerien kasvuun (Schukken ym. 1988). Toistuvalla pakastamisella, nopealla sulatuksella ja pidentyneellä pakastusajalla on todettu negatiivisia vaikutuksia mykoplasmojen kasvuun (Biddle ym. 2004). Bakteerien kasvua voivat estää myös antibioottijäämät tai kemikaalit, kuten jäämät puhdistusaineista tai erilaisista vedinkastoista (Boddie & Nickerson 1997, 2002) ja kontaminanttien ylikasvu.

## **2.7 Maidossa olevien tekijöiden vaikutus bakteerien kasvuun**

Monet tekijät maidossa vaikuttavat bakteerien kasvuun. Maito on bakteereille energianlähde ja elinympäristö, josta ne saavat kasvuun tarvitsemansa aineet. Toisaalta maidossa olevat molekyyliyhdisteet, kuten entsyymit ja muut proteiinit, sekä siinä toimivat immuunipuolustuksen solut rajoittavat ja estävät bakteerien kasvua. Maidossa olevat immuunitekijät ovat osa lehmän immuunipuolustusta, jonka tehtävänä on torjua

taudinaiheuttajat. Immuunitekiäjien vaikutus maidossa oleviin bakteereihin jatkuu myös näytteenoton jälkeen, säilytyksen ja kuljetuksen ajan, viljelyyn asti. Bakteereilla on toisistaan poikkeavat kasvuvaatimukset, joten maidon ominaisuudet rajoittavat eri tavoin erilaisten bakteerien kasvua.

Utaretulehdusbakteerien torjunnassa ovat mukana sekä synnynnäinen että hankittu immuunipuolustus. Hankitun immuunipuolustuksen komponenteista maidossa on läsnä lähinnä immunoglobuliineja eli vasta-aineita, jotka ovat spesifisiä jollekin aiemmin elimistöön tunkeutuneelle taudinaiheuttajalle. Erityisesti ternimaidossa on runsaasti vasta-aineita (Stelwagen ym. 2008). Synnynnäinen immuunipuolustus suojaa elimistöä kaikkia taudinaiheuttajia vastaan ja sen toiminta käynnistyy nopeammin. Maidossa esiintyvä synnynnäinen immuunipuolustus voidaan jakaa humoraaliseen, eli nestevälitteiseen, ja soluvälitteiseen puolustukseen (Rainard & Riollet 2006). Humoraaliseen puolustukseen kuuluvat muun muassa entsyymit, luonnolliset vasta-aineet sekä lukuisa joukko muita proteiineja. Soluvälitteiseen puolustukseen kuuluvat maidossa esiintyvät leukosyytit, joita ovat makrofagit ja neutrofiilit.

#### 2.7.1 Vedinkanavan keratiinin rasvahapot

Vedinkanavan kerrostuneesta epiteelistä peräisin oleva keratiini sisältää antibakteerisesti toimivia komponentteja (Rainard & Riollet 2006). Siinä on useita rasvahappoja, joilla on todettu lajispesifisiä antibakteerisia vaikutuksia *in vitro* (Heczko ym. 1979; Willett ym. 1966; Hogan ym. 1987, 1988; Nair ym. 2005). Runsaimmin vedinkanavan keratiinissa on pitkäketjuisia rasvahappoja C<sub>16</sub>, C<sub>18:1</sub> ja C<sub>18</sub> (Hogan ym. 1986). Yleisesti ottaen ympäristöperäiset bakteerit ovat mainituille rasvahapoille resistentimpiä kuin tartunnalliset bakteerit. Ei ole täysin selvillä, kuinka rasvahapot toimivat estäessään bakteerien kasvua, mutta aiheesta on useita hypoteeseja (Bergsson ym. 1998, 1999; Sun ym. 1998; Projan 1994; Ruzin & Novick 1998). On esitetty esimerkiksi, että rasvahapot vaikuttaisivat bakteerien solukalvojen läpäisevyyteen tai laskisivat bakteerisolujen pH:ta.



### 2.7.2 Rautaa sitovat proteiinit maidossa

Laktoferriini on maidossakin esiintyvä glykoproteiini, jolla on bakteriostaattisia ominaisuuksia (Masson ym. 1996; Rainard & Riollet 2006; Orsi ym. 2004; Kutila 2004). Laktoferriini sitoo tehokkaasti elimistön vapaata rautaa, jota monet bakteerit tarvitsevat kasvuunsa (Weinberg 1978). Lisäksi sillä on todettu johdannaisineen muitakin antimikrobisia vaikutuksia (Rainard & Riollet 2006; Arnold ym. 1980; Ellison ym. 1988; Legrand ym. 2004; Orsi ym. 2004). *E. coli* on laktoferriinille herkin utaretulehdusbakteeri, sen raudantarve on korkea muihin utaretulehdusbakteereihin verrattuna (Rainard & Riollet 2006). Myös *S. aureus* on kohtalaisen herkkä laktoferriinille, mutta streptokokkeihin sillä ei ole todettu bakteriostaattista vaikutusta (Rainard & Riollet 2006). Laktoferriinillä on suoria solukalvoa vahingoittavia vaikutuksia sekä gram-negatiivisiin bakteereihin (Ellison ym. 1988, 1991), että gram-positiivisiin bakteereihin (Jenssen & Hancock 2008). Laktoferriinin antibakteerinen merkitys maidossa on todennäköisesti pieni normaalisti lypsykauden aikana, mutta ummessaolokauden ja akuutin tulehduksen aikana sillä on suurempi merkitys (Rainard & Riollet 2006).

Transferriini on toinen, joskin vähämerkityksinen, lehmän maidossa todettu rautaa sitova proteiini. Se on seerumin proteiini, mutta pääsee utaretulehduksen aikana tiikhumaan plasman mukana verenkierrosta tulehduspaikalle (Rainard & Riollet 2006).

### 2.7.3 Muita antimikrobisia proteiineja

Lysotsyymi on maidon entsyymi, joka tappaa joitain bakteerilajeja hajottamalla niiden soluseinää (Rainard & Riollet 2006; Ellison ym. 1991). Sen merkitystä ei pidetä kovin huomattavana. Se voi vaikuttaa yhdessä vasta-aineiden, komplementin tai laktoferriinin kanssa. Antibakteerisia vaikutuksia on havaittu myös maidossa esiintyvillä entsyymeillä laktoperoksidaasilla ja ksantiinioksidaasilla (Rainard & Riollet 2006).

Luonnollisia vasta-aineita esiintyy lehmän seerumissa ilman tunnettua altistumista vastaavalle antigeenille (Saini ym. 1999). Ne pääsevät tulehduksen aikana maitoon plasman tihkumisen kautta ja kiinnittyvät antigeenien pinnalle edistämällä näiden fagosytoitumista (Rainard & Riollet 2006).

Komplementti koostuu useista plasman proteiineista. Ne pääsevät verenkierrasta maitoon tulehduksen aiheuttamien muutosten seurauksena plasman tihkumisen mukana (Rainard 2003). Niitä on myös jossain määrin terveen utareen maidossa. Komplementin osat toimivat monella tavoin. Ne vaikuttavat suoraan bakteerien solukalvoa vahingoittamalla, lisäävät kapillaarien läpäisevyyttä, houkuttelevat fagosyyttejä tulehduspaikalle ja edistävät fagosytoosia (Rainard 2003).

#### 2.7.4 Immuunipuolustuksen solut maidossa

Neutrofiilit tulevat bakteerien esiintymisen seurauksena maitorauhaseen ensimmäisenä, mutta ovat melko lyhytikäisiä. Neutrofiilit ovat fagosyyttejä eli syöjäsoluja. Ne sulkevat sisäänsä patogeenejä ja tuhoavat niitä tuottamallaan antimikrobisilla molekyylilyhdisteillä (Tizard 2009). Nämä neutrofiilien tuottamat molekyylit, kuten lysosomaaliset entsyymit ja antimikrobiset peptidit vahingoittavat bakteerien solukalvoja (Tizard 2009). Bakteerit, jotka pystyvät suojautumaan näiltä, voivat elää fagosytoivien solujen sisällä.

Makrofagit ovat pääasiallinen solutyyppi maidossa ja ummessaolokauden utare-eritteessä (Rainard & Riollet 2006). Myös makrofagit ovat fagosyyttejä. Niiden elinikä on pidempi kuin neutrofiilien ja ne pystyvät toistuvaan fagosytoosiin. Kroonisessa tulehduksessa makrofagien rooli on merkittävä. Makrofagit toimivat yhteistyössä muiden tulehdukseen liittyvien komponenttien kanssa tuottamiensa sytokiinin välityksellä.

## 2.8 Viljely

Maitonäytteen viljely eskuliinia sisältävälle veriagarille on yleisesti utaretulehdusdiagnostiikassa käytetty perusmenetelmä. Viljely tehdään bakteerieristystä ja -tunnistusta varten. Sopivin kasvualusta lehmien utaretulehdusbakteerien viljelyssä olisi lehmän punasolut tai kokoveri, mutta myös lampaanverta voidaan käyttää (Hogan ym. 1999). Useissa tutkimuksissa käytetyt mastiittiagarit sisältävät 5 % lampaanverta ja 0,05 % eskuliinia (Sears ym. 1990; Dinsmore ym. 1992). Ennen viljelyä näytteen annetaan lämmetä huoneenlämpöön ja se sekoitetaan hyvin (EVIRA 2009a). Neljänneskohtaisia näytteitä viljeltäessä ja tavallista 10 µl:n viljelytilavuutta käytettäessä agarmalja voidaan jakaa neljään osaan. Viljely pyritään suorittamaan niin, että tuloksena saadaan yksittäin kasvavia bakteeripesäkkeitä. Jos näyte on viljelty liian pienelle alueelle agarmaljalla, maidossa olevat tekijät, kuten antimikrobiset proteiinit, peptidit ja lipidit (Stelwagen 2008; Rainard & Riollet 2006) voivat estää mikrobien kasvua (Hogan ym. 1999). Eviran ohjeiden (EVIRA 2009a) mukaan kertakäyttösilmukka kastetaan kerran maitonäytteeseen ja maljan neljännekseen tehdään viivaviljelynä yhteensä 6-8 vetoa. Silmukka käännetään, kun puolet aiotuista vedoista on tehty. Elatusainemaljaa inkuboidaan 48 tunnin ajan 37 °C:ssa ja bakteerikasvu tarkistetaan 24 ja 48 tunnin jälkeen (Hogan ym. 1999).

Tarvittavat inkubaatioajat ja optimilämpötilan alarajat vaihtelevat mikrobilajeittain. Yli 48 tunnin inkubaatioaikoja saattavat kasvaakseen vaatia jotkin hiivat, homeet tai muut sienet, *Nocardia spp.*, *Prototheca spp.*, *C. bovis*, *A. pyogenes*, *Mycobacterium spp.* ja *Mycoplasma spp.* (Hogan ym. 1999).

Viljelystä voidaan saada tulokseksi joko puhdaskasvu, sekakasvu tai ei ollenkaan mikrobikasvua. Suomessa käytössä olevan tulkinnan mukaan puhdaskasvuksi katsotaan vähintään 5 keskenään samanlaista pesäkettä, joko yhtä tai kahta bakteerilajia (EVIRA 2009a). Poikkeuksena on *Str. agalactiae*, josta yksikin puhtaana kasvava pesäke huomioidaan. Sekakasvussa on kolmea tai useampaa bakteerilajia. Sekä virhepositiiviset että virhenegatiiviset tulokset ovat mahdollisia. Virhenegatiiviset tulokset tarkoittavat, että bakteerikasvua ei havaita, vaikka näyte on peräisin

infektoituneesta neljänneksestä. Virhepositiiviset tulokset puolestaan tarkoittavat, että viljelyssä tunnistetaan bakteeri, joka ei ole tutkitun infektion aiheuttaja. Tulos on varmempi, kun se on todettu rinnakkaisnäytteiden tai peräkkäisten näytteenottojen avulla (Hogan ym. 1999).

## **2.9 Viljelytuloksen parantaminen näytteen esikäsittelyjen ja näytemäärän lisäämisen avulla**

### **2.9.1 Pakastaminen**

Pakastamisen vaikutusta maitonäytteessä olevien bakteerien löytymiseen on selvitetty useilla tutkimuksilla. Tieto on hyödyllistä, sillä pakastamista käytetään tavanomaisessa diagnostiikassa näytteiden kuljetuksen aikana, jos viljelyä ei voida suorittaa 24-48 tunnin kuluessa (Hogan ym. 1999).

Tutkimusten tulokset ovat osittain toisistaan poikkeavia, mutta niissä voidaan kuitenkin nähdä tiettyä johdonmukaisuutta. On havaittu, että pakastaminen parantaa *S. aureuksen* diagnostiikan herkkyyttä (Godden ym. 2002; Villanueva ym. 1991; Sol ym. 2002). Myös *Str. agalactiaen* (Villanueva ym. 1991) ja KNS:n (Schukken ym. 1988) löytymiseen pakastuksella on ollut positiivista vaikutusta. Villanueva ym. (1991) totesivat tutkimuksessaan, että *Str. agalactiaeta* eristettiin pakastamisen seurauksena jopa 2,5 kertaa enemmän ja *S. aureusta* 1,48 kertaa enemmän kuin perusmenetelmällä ilman pakastamista. Parantuneelle eristämislle on ehdotettu syyksi muun muassa elävien bakteerien vapautumista makrofagien sisältä. Koliformisten bakteerien kasvuun pakastamisella on sitä vastoin ollut negatiivinen vaikutus (Schukken ym. 1988). Pakastus voi siis olla diagnostiikalle joko hyödyksi tai haitaksi riippuen tutkittavasta bakteerista.

Pakastusajalla on havaittu olevan merkitystä. Kun näytteitä pakastettiin 4, 8 ja 16 viikon ajan, sekä positiiviset että negatiiviset vaikutukset olivat sitä huomattavampia, mitä pidempi pakastusaika oli (Schukken ym. 1988). Vajaan vuorokauden mittaisella pakastuksella ei havaittu vaikutusta kolimuotoisten bakteerien elävyyteen, eikä se

myöskään lisännyt diagnostiikan herkkyyttä minkään bakteerilajin kohdalla (Dinsmore ym. 1992). Villanuevan (1991) tekemässä tutkimuksessa huomattava vaikutus saatiin 23 vuorokauden pakastamisella. Godden ym. (2002) havaitsivat *S. aureuksen* pmy:iden lisääntyvän 14 vuorokauden pakastusajan seurauksena. Viittaamissani tutkimuksissa käytetty pakastuslämpötila on -20 °C.

### 2.9.2 Maidon inkubaatio ennen viljelyä ja maitomäärä

Pakastamisen lisäksi bakteriologisen tutkimuksen herkkyyttä on yritetty parantaa muun muassa inkuboimalla maitonäytettä ennen viljelyä ja suurentamalla viljeltävää maitomäärää. Molempien toimenpiteiden tarkoituksena on lisätä näytteessä olevien elävien bakteerien määrää. Tässä on onnistuttukin. Viljelyä edeltävän inkubaation avulla on saatu parannettua *S. aureuksen* eristämistä näytteistä (Sol ym. 2002). Samassa tutkimuksessa viljelyä edeltävällä inkubaatiolla ei kuitenkaan ollut juuri vaikutusta *Str. uberiksen* eristämiseen, *Str. dysgalactiaeta* ja *Str. agalactiaeta* taas eristettiin enemmän perusmenetelmällä.

Dinsmore ym. totesivat maitomäärän lisäämisen 0,01 ml:sta 0,1 ml:aan parantavan viljelyn herkkyyttä useiden bakteerien havaitsemisessa. Myös viljelyä edeltävä inkubaatio, sekä näiden toimenpiteiden yhdistäminen paransivat viljelyn herkkyyttä kyseisessä tutkimuksessa. Toimenpiteet lisäsivät erityisesti *E. colin* löytymistä maitonäytteistä (Dinsmore ym. 1992). Toiseksi eniten parani ympäristöperäisten streptokokkien havaitseminen. Pitkä inkubaatioaika kuitenkin lisäsi huomattavasti sekakasvua. Herkkyyden parantaminen viljelyä edeltävän inkubaation ja maitomäärän lisäämisen avulla voi edistää kontaminanttibakteerien kasvua. Yleisen käytännön mukaisesti näytteet tulee jäähdyttää välittömästi ja niitä tulee käsitellä niin, että näyte säilyy viljelyyn asti mahdollisimman samankaltaisena kuin se oli näytteenottohetkellä. Kontaminanttibakteerien kasvu voi estää varsinaisen aiheuttajabakteerin eristämisen.

## 2.10 Viljelylle vaihtoehtoiset menetelmät diagnostiikassa

Viljely on ollut viime aikoihin asti ainoa laajassa käytössä oleva menetelmä mikrobien toteamiseksi maitonäytteestä ja utaretulehdusten bakteerietiologioiden selvittämiseksi. Tutkimuksia vaihtoehtoisista menetelmistä on kuitenkin tehty. Lupaavimpia tuloksia on saatu polymeerasiketjureaktioon (PCR) pohjautuvilla menetelmillä.

### 2.10.1 PCR:n lähtökohdat utaretulehdusdiagnostiikassa

Polymeerasiketjureaktio on entsyymaattinen reaktio, josta on nykyisin monia eri sovelluksia käytössä molekyylibiologisessa tutkimuksessa ja monenlaisessa diagnostiikassa. Sitä on käytetty tutkimuksessa jo pari vuosikymmentä. Pelkistetysti PCR on DNA- tai RNA-jaksojen monistamista. Tunnistettava jakso toimii mallina, jolle polymeerasientsyymi rakentaa alukkeiden avulla vastakkaisen juosteen vapaista nukleotideista, kun nukleiinihappojuosteet on ensin lämpötilamuutosten avulla erotettu toisistaan. Alukkeet muodostetaan PCR-reaktiota varten niin, että ne kykenevät tarttumaan vain nukleiinihappopätkään, jossa on tietty emäsjärjestys. Jokaisen halutun DNA- tai RNA-pätkän monistamiseksi on siis oltava tarkoitusta varten sopivat alukkeet. Monistussyklejä toistetaan haluttu määrä. Reaktio-olot, kuten käytettävät lämpötilat ja syklin vaiheiden kesto suunnitellaan monistettavan geneettisen jakson rakenteen, reaktiossa käytettävien komponenttien ja välineistön perusteella mahdollisimman sopiviksi. Perinteisellä PCR-menetelmällä geneettinen jakso voidaan monistaa miljoonia kertoja muutamassa tunnissa.

Utaretulehdusdiagnostiikassa alukkeeksi valitaan tunnistettavan bakteerin DNA:n jakso, joka on spesifinen vain kyseiselle bakteerille. Yleensä tämä jakso on sellainen geeni, jonka toiminta on bakteerille välttämätöntä. Perinteistä PCR:ää käytettäessä monistettu PCR-tuote ajetaan agarosigeelissä. Eripituiset DNA-jaksot liikkuvat geelissä eri nopeuksilla. Näin saadaan erotettua erikokoiset DNA-jaksot. Jos näytteessä on tunnistettavaa bakteeria, UV-valolla tarkastellussa geelissä näkyy tyypillinen vyöhyke eli bändi. Tiedon puute haluttujen bakteerien genomien sekvenssistä on rajoittanut PCR:n käyttöä utaretulehdusdiagnostiikassa. Käytävissä olevan tiedon määrä kuitenkin

lisääntyy jatkuvasti ja eri utaretulehdusbakteerien tunnistamiseen sopivia alukkeita kehitetään (Brakstad ym. 1992, Ghadersohi ym. 1997; Riffon ym. 2001). Alukkeiden spesifisyys vaikuttaa ratkaisevasti koko menetelmän spesifisyyteen ja herkkyYTEEN.

#### 2.10.2 Utaretulehdusbakteerien DNA:n monistus PCR:llä maitonäytteestä

Maito on erittäin haasteellinen tausta-aine ajatellen bakteerien DNA:n monistamista PCR:llä. Erityisesti tulehtuneen neljänneksen maidossa on tekijöitä, jotka häiritsevät polymeerasiketjureaktiota ja aiheuttavat virhenegatiivisia tuloksia (Khan ym. 1998; Baird ym. 1999; Gillespie & Oliver 2005). Aiemmin käytäntönä on ollut tutkittavien bakteerien kasvattaminen viljelemällä PCR:ää varten, jotta maidossa olevat tekijät eivät häiritsisi reaktiota ja jotta haluttua geneettistä materiaalia olisi riittävästi.

Nykyisin PCR:ää edeltävää viljelyä ei tarvita, vaan DNA:ta voidaan monistaa suoraan maitonäytteestä. Tarvitaan kuitenkin erilaisia esikäsittelyjä, joilla DNA erotetaan ja puhdistetaan. Tällaisia käsittelyjä ovat esimerkiksi solujen ja proteiinien entsymaattinen hajottaminen, pesut laimentamalla fosfaattipuskuroituun suolaliuokseen ja näytteen kuumennus (Khan ym. 1998; Riffon ym. 2001; Welsh & McCelland 1990; Gillespie & Oliver 2005). Näillä käsittelyillä on pyritty lisäämään menetelmien herkkyyttä, jota maidon ominaisuudet ovat rajoittaneet. Khan ym. (1998) totesivat, että herkkyys parani 52,6 %:sta 90 %:iin, kun näytteen esikäsittelyyn kuuluvien pesujen määrä lisättiin kahdesta viiteen. Tutkittavat maitonäytteet olivat peräisin kokeellisesti aiheutetuista infektioista. Samassa tutkimuksessa herkkyys oli 100 % vesi- ja maitonäytteissä, joihin oli keinotekoisesti lisätty *S. aureusta*.

Näytteen esikäsittelyn helpottamista on tutkittu taloudellisen kannattavuuden ja käyttäjäystävällisyyden lisäämiseksi (Riffon ym. 2001). Tällöin joudutaan kuitenkin helposti tekemään kompromisseja herkkyuden suhteen (Gillespie & Oliver 2005). Menetelmien herkkyyttä on pyritty kehittämään myös esimerkiksi etsimällä tarkoitukseen entistä sopivampia polymeeraaseja (Kim ym. 2001). *Taq* DNA polymeeraasit ovat osoittautuneet toistaiseksi käyttökelpoisimmiksi entsyymeiksi utaretulehdusbakteerien DNA:n monistamiseen PCR:llä.

### 2.10.3 Utaretulehdusbakteerien tunnistus maidosta kvantitatiivisellä PCR:llä

Viime aikoina runsaasti tutkittu ja käyttökelpoinen PCR:n sovellus on reaaliaikainen PCR (Espy ym. 2006; Kubista ym. 2006). Tässä menetelmässä PCR:llä tapahtuvaan monistukseen yhdistetään monistustuotteen tunnistus reaaliaikaisesti fluoresenssin avulla. Tunnistamista varten reaktiossa tarvitaan fluoresoivaa väriainetta tai spesifistä leimattua tunnistinta, joka sitoutuu muodostuvaan kaksijuosteiseen DNA:han (Kubista ym. 2006). Sitoutumisesta seuraa fluoresoiva signaali, jonka voimakkuus riippuu sitoutuneen väriaineen tai tunnistimen määrästä, toisin sanoen muodostuneen reaktiotuotteen määrästä. Signaali on heikko reaktion alkuvaiheessa, mutta voimistuu eksponentiaalisesti sen loppua kohti. Lopulta signaalin voimakkuus asettuu vakaalle tasolle, kun jokin reaktion komponenteista on käytetty loppuun. Fluoresenssin määrä voidaan tunnistaa joka monistussyklin jälkeen (Kubista ym. 2006). Alkuperäisessä näytteessä ollut tunnistettavan DNA:n määrä saadaan selville ekstrapoloimalla Cycle threshold (Ct) -arvon avulla. Ct-arvo on PCR-syklien määrä, joka tarvitaan tietyn fluoresenssitason asetetun raja-arvon ylittämiseen. Näytteessä olevat reaktiota häiritsevät tekijät voivat kuitenkin vääristää arviota näytteessä alunperin olleesta DNA:n määrästä (Kubista ym. 2006). Reaaliaikaista PCR:ää käytettäessä geelielektroforeesia ei tarvita, jolloin koko prosessiin kuluva aika lyhenee huomattavasti.

Multiplex PCR on PCR-menetelmä, jossa on samassa reaktiossa mukana useita, eri DNA-jaksoille spesifisiä alukkeita. Tämä mahdollistaa useamman DNA-sekvenssipätkän tunnistamisen samassa määrittäyksessä. Monistettavien sekvenssien on oltava ominaisuuksiltaan riittävän samankaltaisia, jotta samat reaktio-olosuhteet sopivat niille (Phuektes ym. 2001). Useamman bakteerin tunnistaminen samassa määrittäyksessä lisää taloudellista kannattavuutta, mutta herkkyydelle se asettaa kuitenkin haasteita (Phuektes ym. 2001). Lisäksi eri bakteerien tunnistamisessa käytettyjen DNA-jaksojen erottaminen toisistaan geelielektroforeesilla on hankalaa, jos ne ovat suunnilleen saman pituisia.



Kun käytetään multiplex PCR:n ja reaaliaikaisen PCR:n yhdistelmää bakteerien tunnistamisessa suoraan maidosta (Gillespie & Oliver 2005; Koskinen ym. 2009), diagnostiikka on huomattavasti nopeampaa kuin aiemmissa sovelluksissa. Yhdistämällä reaaliaikainen PCR multiplex PCR:ään sivuutetaan myös geielektroforeesiin liittyvät ongelmat (Gillespie & Oliver 2005). Reaaliaikaisessa multiplex PCR:ssä fluoresoivina merkkeinä on käytettävä spesifisiä leimattuja tunnistimia tai alukkeita. Väriaineet sitoutuvat epäspesifisesti mihin tahansa kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin reaktiotuotteita ei voida erottaa (Kubista ym. 2006).

#### 2.10.4 PCR:n mahdollisuuksia utaretulehdusdiagnoosissa

Diagnostiikan kannalta merkittävimpiä PCR:llä tavoiteltuja etuja ovat spesifisyys ja herkkyys. Näiden ohella huomattavaa käytännön merkitystä on nopeudella, taloudellisella kannattavuudella ja käyttäjäystävällisyydellä. Nopeuden ja käyttäjäystävällisyyden merkitys korostuu erityisesti mykoplasmojen diagnostiikassa, sillä niiden tunnistaminen viljelyllä on hidasta ja hankalaa. PCR:llä on saatu lupaavia tuloksia mykoplasmojen tunnistamisesta sekä tankkimaidosta että yksittäisten lehmien maidosta (Baird ym. 1999; Cai ym. 2005). Koska PCR perustuu DNA:n tunnistamiseen, sillä voidaan havaita ja tunnistaa näytteestä myös kuolleet bakteerit. Diagnostiikkaa eivät estä bakteerien kasvua estävät aineet, esimerkiksi formaliini tai antibioottijäämät (Khan ym. 1998). Kun tutkitaan tietyn taudinaiheuttajan esiintymistä näytteessä, ympäristöperäiset kontaminanttibakteerit eivät häiritse PCR:n avulla tapahtuvaa tunnistamista (Baird ym. 1999), sillä PCR-reaktiossa ainoastaan käytetyille alukkeille komplementaarinen bakteerien DNA monistuu. Edellä kuvatut PCR:n ominaisuudet tarjoavat mahdollisuuksia moniin käyttäjäystävällisiin sovelluksiin ja mahdollistavat diagnostiikan useissa tapauksissa, joissa viljelyllä ei saada tulosta.

Jäljempänä esitellyssä tutkimuksessa käytetty PathoProof<sup>TM</sup> Mastitis PCR Assay -menetelmä on kvantitatiivinen tunnistusmenetelmä, jossa tunnistetaan samassa reaktiossa useita bakteereja reaaliaikaisella PCR:llä (Koskinen ym. 2009). Tähän menetelmään perustuu myös Suomessa markkinoilla oleva MasTest<sup>TM</sup>. PathoProof<sup>TM</sup> Mastitis PCR Assay -menetelmässä näyte esikäsitellään hajottamalla entsymaattisesti

utaretulehdusmaidossa esiintyvät somaattiset solut, erottamalla bakteerisolut sentrifugoimalla monista reaktiota häiritsevistä tekijöistä, hajottamalla bakteerien soluseinät entsyymaattisesti ja eristämällä bakteerien DNA magneettisesti. Näytettä tutkitaan sen jälkeen neljässä PCR-reaktiossa, joista jokainen tunnistaa kolmea eri kohdetta. Testiin on valittu 11 yleisintä utaretulehdusta aiheuttavaa bakteeria tai bakteeriryhmää, sekä stafylokokkien penisilliiniresistenssiä koodaava  $\beta$ -laktamaasigeeni. Lisäksi jokaisessa reaktiossa on mukana sisäinen kontrolli (IAC), jolla varmistetaan reaktio-olosuhteiden sopivuus. Menetelmän spesifisyyden ja herkkyyden on todettu olevan 100 % kliinisistä utaretulehduksista peräisin oleville näytteille (Koskinen ym. 2009).

#### 2.10.5 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on antigeenin ja vasta-aineen immunologiseen kiinnittymiseen perustuva tunnistusmenetelmä (Engvall & Perlmann 1972). Sillä voidaan sovelluksineen tunnistaa joko utaretulehdusbakteerien vasta-aineita (Matsushita ym. 1990; Fox & Adams 2000) tai antigeenejä (Ball ym. 1991; Zorah ym. 1993). Antigeeni on jokin elimistölle vieras molekyyli, tässä tapauksessa esimerkiksi utaretulehdusbakteerin pintarakenne. ELISA:lla voidaan havaita myös esimerkiksi bakteerien muodostamia myrkkyjä (Loeffler ym. 1988). Menetelmä tunnistaa näin ollen myös bakteereja, jotka eivät kasva viljelyssä. ELISAA onkin käytetty sellaisten näytteiden tutkimiseen, jotka ovat olleet perinteisellä viljelymenetelmällä tutkittaessa negatiivisia. Zorah ym. (1993) löysivät bakteeriantigeenejä 68 %:ssa näytteistä, jotka olivat viljelyssä negatiivisia. Eri bakteerien osuudet olivat: *E. coli* 51,2 %, *Str. agalactiae* 7,1 % ja *Str. uberis* 3,6 %. *S. aureusta* ja *Str. dysgalactiaeta* ei havaittu. Kuten PCR:llä, myöskin ELISA:lla voidaan havaita ainoastaan ne taudinaiheuttajat, joita nimenomaan etsitään. ELISAan perustuvat menetelmät eivät ole vakiinnuttaneet asemaansa käytännön utaretulehdusdiagnostiikassa.

### 3 TUTKIMUSOSA

Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan tuotantoeläinsairaalan praktiikka-alueelta kerättiin vuosina 2004–2008 kliinisistä utaretulehdustapauksista otettuja näytteitä, joissa ei havaittu bakteerikasvua viljelemällä. Näistä maitonäytteistä määritettiin Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksen laboratoriossa NAGaasi-aktiivisuus ja tutkittiin Finnzymes Oy:ssä yhdentoista yleisimmän utaretulehdusbakteerin tai bakteeriryhmän DNA:n löytymistä PathoProof Mastitis PCR Assay -menetelmällä. Osasta näytteistä määritettiin myös soluluku. Jos lehmää käytiin hoitamassa tilalla, utaretulehduksen kliiniset oireet kirjattiin potilasohjelmaan. Tämän tutkimuksen tarkoitus oli selvittää, onko myös viljelyssä negatiivisissa näytteissä löydettävissä utaretulehdusbakteerien DNA:ta ja jos, niin minkä bakteerien. Lisäksi verrattiin NAGaasi-aktiivisuuksien ja kliinisten oireiden esiintymisen suhdetta siihen tietoon, löytyikö näytteistä jonkin utaretulehdusbakteerin DNA:ta vai ei.

#### 3.1 Aineisto ja menetelmät

##### 3.1.1 Näytteet ja taustatiedot

Maitonäytteet olivat peräisin Helsingin yliopiston eläinlääketieteellisen tiedekunnan tuotantoeläinsairaalan praktiikka-alueen kliinisistä utaretulehdustapauksista. Näytteet kerättiin neljän vuoden aikavälillä, alkaen maaliskuusta 2004. Näytteitä oli yhteensä 79, ne olivat 46 tilalta ja 67 eri lehmästä. Osa näytteistä oli otettu tilalla potilaskäynnin yhteydessä, osa taas oli tuottajien itse laboratorioon tuomia. Mukana oli myös kaksi praktiikka-alueen ulkopuolelta tutkittavaksi lähetettyä näytettä. Potilaskäyntien yhteydessä otetut näytteet toimitettiin laboratorioon potilasmatkoilta palattua. Tuottajat ottivat näytteet aamulypsillä ja toivat ne laboratorioon noin neljän tunnin kuluessa näytteenotosta. Tuottajillekin annetun ohjeen mukaan neljänneksistä lypsettiin alkusuihkeet ja vetimien päät puhdistettiin huolellisesti sekä näkyvästä liasta että desinfioimalla aseptiseen aineeseen kostutetulla pumpulilla. Näytteet tuli säilyttää jääkaapissa ennen toimittamista tutkittavaksi. Ohjeet maitonäytteenotosta ovat liitteenä.

### 3.1.2 Tutkimuksen kulku

Maitonäytteet viljeltiin Helsingin yliopiston kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksen laboratoriossa Tammertutkan lammasveriagareille (Tammertutka, Tampere). Viljely suoritettiin Eviran menetelmäohjeen (EVIRA 2009a) mukaisesti. Käytetty viljelytilavuus oli 10 µl. Näytteitä inkuboitiin aerobisesti 37 °C:ssa ja kasvu tarkistettiin sekä 24 tunnin että 48 tunnin kuluttua. Tutkimukseen otettiin mukaan ainoastaan sellaiset näytteet, joissa ei havaittu lainkaan bakteerikasvua.

Soluluku määritettiin käytännön syistä vain 55,7 %:sta (44/79) maitonäytteestä. Laskenta suoritettiin käyttämällä kaupallista DeLaval DCC-solulaskuria (DeLaval, Tumba, Ruotsi).

Näytteet pakastettiin pitkän keräämisajan vuoksi viljelyn ja solujen laskennan jälkeen odottamaan jatkomäärittämiä. Pakastuslämpötila oli -18 °C. Kutakin näytettä pakastettiin kahteen Eppendorf-putkeen, joista toinen lähetettiin aineiston kokoamisen jälkeen Finnzymes Oy:n tutkittavaksi PathoProof<sup>TM</sup> Mastitis PCR Assay -menetelmällä. Toisesta tehtiin NAGaasi-aktiivisuuden määrittäminen Helsingin yliopiston kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksen laboratoriossa.

Maidon NAGaasi-aktiivisuus mitattiin NAGaasi-entsyymien (4-metyyliumbelliferoni-N-asetyyli-β-D-glukosaminidista) vapauttaman reaktiotuotteen (4-metyyliumbelliferoni) fluoresenssin määrittämiseen perustuvalla Kitchenin ym. (1978) kehittämällä menetelmällä käyttäen Mattilan ja Sandholmin (1985) sovellusta, Helsingin yliopiston kliinisen tuotantoeläinlääketieteen laitoksen työohjeen mukaan. Kyseisellä tavalla mitattuna terveestä neljänneksestä lypsetyn maidon NAGaasi-aktiivisuus on 0.18-0.66 pmol 4-MU/min/µl maitoa. Mittauksen detektorajajat olivat 0,1-24,49 pmol 4-MU/min/µl maitoa. NAGaasi-aktiivisuuksien keskiarvoja laskettaessa on käytetty arvoa 24,49 pmol 4-MU/min/µl maitoa niille näytteille, joiden NAGaasi-aktiivisuus ylitti määrittämisen tunnistaman yläraja-arvon.

DNA eristettiin ja PCR-reaktiot suoritettiin maitonäytteistä PathoProof<sup>TM</sup> Mastitis PCR Assay -menetelmällä (Finnzymes Oy, Espoo). Menetelmä tunnistaa 11 eri bakteeria tai

bakteeriryhmää, sekä stafylokokkien penisilliiniresistenssiä koodaavan  $\beta$ -laktamaasigeenin. Tunnistettavat bakteerit olivat: 1) *S. aureus*, 2) KNS, 3) *Str. agalactiae*, 4) *Str. dysgalactiae*, 5) *Str. uberis*, 6) *E.coli*, 7) *Enterococcus spp.* (*Enterococcus faecalis* ja *Enterococcus faecium*), 8) *Klebsiella spp.* (*Klebsiella oxytoca* ja *Klebsiella pneumoniae*) , 9) *C. bovis*, 10) *A. Pyogenes* ja *P. indolicus*. sekä 11) *Serratia marcescens*.

Saadut tulokset taulukoitiin ja liitettiin yhteen potilasaineiston tietojen kanssa. Kaikki tapaukset, joista tuottajat olivat itse tuoneet näytteet tutkittavaksi, luokiteltiin lieväksi kliiniseksi utaretulehdukseksi. Tapaukset, joissa eläinlääkäri oli käynyt tilalla, luokiteltiin oireiden perusteella joko lieväksi tai vakavaksi kliiniseksi utaretulehdukseksi. Vakaviksi kliinisiksi utaretulehduksiksi luokiteltiin tapaukset, joissa lehmillä oli yleisoireita ilman muuta ilmeistä syytä. Yleisoireita ovat muun muassa syömättömyys, kuume, kohonnut pulssi sekä pötsin toiminnan pysähtyminen. Lieviksi kliinisiksi utaretulehduksiksi luokitellut tapaukset eivät aiheuttaneet yleisoireita, vaan joko maitomuutoksia, kuten värin muutosta ja hyytymiä tai utareen paikallisoireita, kuten turvotusta, lämpöä, kipua tai tiivistymiä.

### 3.2 Tulokset

Tutkituista maitonäytteistä, joiden viljelytulos oli negatiivinen, 43,0 %:ssa (34/79) todettiin PathoProof-menetelmällä yhden tai kahden yleisen utaretulehdusbakteerin DNA:ta. DNA:ta oli useissa näytteissä runsaasti. Tunnistettujen bakteerien osuudet kaikista tutkituista näytteistä olivat: KNS 13,9 %, *Str. uberis* 12,7 %, *C. bovis* 7,6 %, *S. aureus* 3,8 %, *Str. dysgalactie* 3,8 %, *E. coli* 1,3 %, *A. pyogenes* 1,3 % ja *Enterococcus spp.* 1,3 %. Kahdessa näytteessä todettiin merkittävä määrä kahta eri bakteeria, muutoin positiivissa näytteissä todettiin vain yhtä bakteeria. Löydösten määrät on ilmoitettu bakteerilajeittain taulukossa 1. Stafylokokkien penisilliiniresistenssiä koodaava  $\beta$ -laktamaasigeeni löydettiin neljästä näytteestä, joissa todettiin KNS.

**Taulukko 1.** Bakterilöydösten määrät kaikista tutkituista näytteistä , sekä vakaviin klinisiin utaretulehduksiin liittyvistä näytteistä.

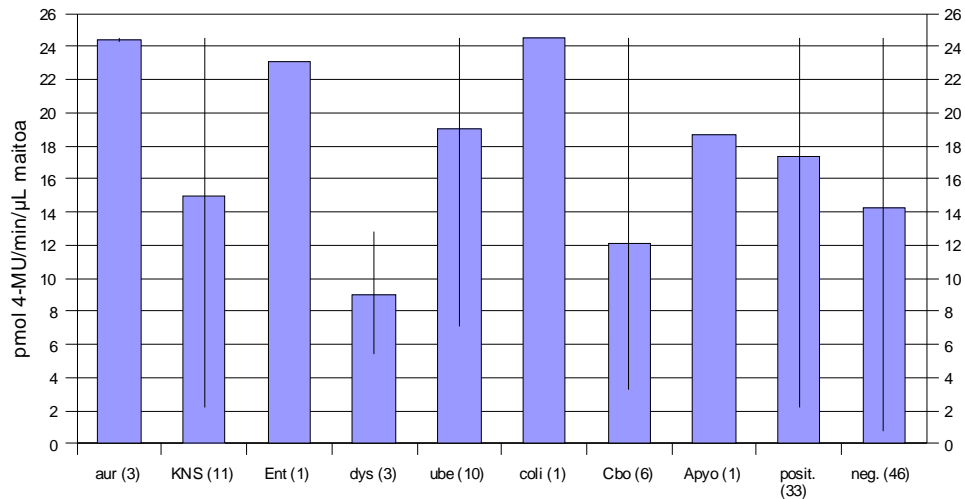
Diagnoosi menetelmällä	PCR- Löydösten määrä kaikista tutkituista näytteistä	Löydösten määrä vakaviin klinisiin utaretulehduksiin liittyvistä näytteistä
<i>S. aureus</i>	3	1
KNS	9	0
<i>E. faecalis/ E. faecium</i>	1	0
<i>Str. dysgalactiae</i>	2	1
<i>Str. uberis</i>	10	4
<i>E. coli</i>	1	1
<i>C. bovis</i>	5	1
<i>A. pyogenes</i>	1	1
KNS ja <i>C. bovis</i>	1	0
KNS ja <i>Str. dysgalactiae</i>	1	0
Bakteerien DNA:ta ei havaittu	45	3
Yhteensä	79	12

Kahdellatoista lehmällä oli yleisoireita. 75 %:lla (9/12) lehmistä, joilla oli yleisoireita, todettiin näytteestä jokin utaretulehdusbakteeri. Eri aiheuttajabakteerien osuudet näistä tapauksista käyvät ilmi taulukosta 1. Kolmea tapausta lukuunottamatta näytteet, joissa ei todettu bakteeriperäistä DNA:ta, olivat peräisin lievista klinisistä utaretulehduksista.

Niiden näytteiden NAGaasi-aktiivisuuksia, joissa todettiin PCR:llä jokin bakteeri, verrattiin niiden näytteiden NAGaasi-aktiivisuuksiin, joissa ei PCR:llä todettu bakteereja. Bakterilajikohtaiset maidon NAGaasi-aktiivisuuksien keskiarvot ja NAGaasi-aktiivisuuksien vaihteluvälit käyvät ilmi kuvasta 1. NAGaasi-aktiivisuudet eivät olleet merkittävästi korkeammat näytteissä, joista löydettiin jokin bakteeri, kuin niissä näytteissä, joista ei löydetty bakteereja. Kaikissa tutkituissa näytteissä NAGaasi-aktiivisuus oli korkeampi kuin terveestä neljänneksestä lypsetyn maidon normaali NAGaasi-aktiivisuus. NAGaasi-aktiivisuuden tulos puuttuu yhdestä näytteestä, koska

maito oli niin muuttunutta, ettei se soveltunut mittaukseen. Kyseisellä lehmällä oli yleisoireita, mutta näytteestä ei todettu taudinaiheuttajaa.

**Kuva 1.** Näytteiden NAGaasi-aktiivisuudet



NAGaasi-aktiivisuuksien keskiarvot on kuvattu pylväinä ja vaihteluväli viivana.

aur = *S. aureus*

Ent = *E. faecalis* ja *E. faecium*

dys = *Str. dysgalactiae*

ube = *Str. uberis*

coli = *E. coli*

Cbo = *C. bovis*

Apyo = *A. pyogenes*

posit. = Kaikki näytteet, joista eristettiin utaretulehdusbakteerin DNA:ta

neg. = Näytteet, joista ei eristetty minkään utaretulehdusbakteerin DNA:ta

Sulkeissa oleva luku ilmaisee näytteiden määrän kussakin kategoriassa.

Kahdeksalla lehmällä soluluku oli alle 200 000 solua/ml. Yhdellä näistä todettiin näytteestä *C. bovis* ja toisella oli yleisoireita. Näiden näytteiden maidon NAGaasi-aktiivisuuksien keskiarvo oli 12,22 ja ääriarvot 0,75 – 20,94 pmol 4-MU/min/μl maitoa.

### 3.3 Pohdinta

Yli neljäsosassa viljellyistä näytteistä ei havaita bakteerikasvua. Nämä negatiiviset viljelytulokset ovat ongelmallisia ja turhauttavia sekä tuottajien, eläinlääkärien, että laboratorioden kannalta. Aikaa ja rahaa kuluu hukkaan, työmäärä lisääntyy ja utaretulehdusten hoitojen sekä ennaltaehkäisyyn suunnittelu vaikeutuu. Taudinaiheuttaja tulisi tutkia kaikista hoidettavista utaretulehduksista. Negatiivisten viljelytulosten saaminen voi kuitenkin vähentää motivaatiota maitonäytteiden tutkimiseen.

Tässä tutkimuksessa lähes puolesta viljelyssä negatiivisista näytteistä tunnistettiin jonkin utaretulehdusbakteerin DNA:ta. Tunnistetut bakteerit kuuluivat kahdeksaan eri bakteerilajiin tai -ryhmään. Ne olivat tavallisia utaretulehdusbakteereja ja pääosin sellaisia, joiden eristämistä viljelyllä ei pidetä erityisen hankalana. *E. colia* eristettiin vain yhdestä näytteestä. Tämä tutkimus ei siis tue oletusta, että negatiiviset viljelytulokset olisivat pääasiassa koliformien aiheuttamia. *S. aureusta* eristettiin kolmesta näytteestä. *S. aureuksen* kausittainen erittyminen kroonisissa infektioissa (Sears ym. 1990) ei myöskään ole tämän tutkimuksen perusteella kovin merkittävä syy negatiivisille viljelytuloksille.

Kun näytteestä ei todeta mikrobikasvua, tilanne voi olla kolmenlainen. Joko näytteessä ei ole bakteereja, niitä on liian pieni pitoisuus tai niiden kasvu on estynyt. Liian pieni pitoisuus tarkoittaa tässä yhteydessä sitä, että viljelyotokseen, joka yleensä on 10 µl, ei satu yhtään kasvukykyistä bakteeria.

Vakaviakin kliinisiä oireita aiheuttavien utaretulehdusten spontaani paraneminen on mahdollista (Adams ym. 1992; Hogan ym. 1999). Se voisi olla eräs merkittävä syy negatiivisille viljelytuloksille tässäkin tutkimuksessa. Useammassa kuin puolessa näytteistä ei nimittäin todettu yleisimpien utaretulehdusbakteerien DNA:ta, vaikka nämä näytteet olivat utareen paikallisoireiden ja utareen kudostuhosta kertovien kuvaajien perusteella peräisin kliinisistä utaretulehdustapauksista. Bakteeriperäistä DNA:ta ei löytynyt myöskään kolmessa vakavassa kliinisessä utaretulehdustapauksessa. Utaretulehdusta voivat aiheuttaa myös muut mikrobit, kuin ne, joita tässä tutkimuksessa



käytetyllä PCR-menetelmällä pyrittiin tunnistamaan. On siis mahdollista, että näytteissä olisi ollut muita kuin menetelmän tunnistamia mikrobeja. Ne mikrobit, joita menetelmä ei tunnistanut, ovat kuitenkin nykyisen tietämyksen mukaan Suomessa harvinaisia utaretulehduksen aiheuttajia. Mikrobien lisäksi utaretulehduksia voivat aiheuttaa muutkin utarekudosta ärsytävät tekijät. Näiden tekijöiden merkitys on todennäköisesti pieni. Arviot utaretulehdusbakteerien yleisyydestä perustuvat pääosin viljelemällä tehtyihin tutkimuksiin. Sellaisten bakteerien osuus, jotka kasvavat viljelyssä muita huonommin, voi kenties olla aliarvioitu.

Merkittävä syy negatiivisille viljelytuloksille voi olla se, että utareinfektion aiheuttanut bakteeri vaatisi erityiset viljelyolot kasvaakseen (Hogan ym. 1999). Esimerkiksi *M. bovis* on tällainen bakteeri. Sitä ei kuitenkaan ole todettu Suomessa toistaiseksi (EVIRA 2009b), joten se tuskin on tässä tutkimuksessa negatiivisten viljelytulosten taustalla. Se ei ollut tässä tutkimuksessa tunnistettavien utaretulehdusbakteerien joukossa.

Tapauksissa, joissa näytteessä on taudinaiheuttajan DNA:ta vaikka viljelytulos on negatiivinen, on kysymys bakteerien kasvun estymisestä tai bakteerien pienestä määrästä. Tässä tutkimuksessa eristetyn bakteeriperäisen DNA:n määrä oli useissa näytteissä huomattava. Bakteerien pieni pitoisuus näytteessä ei siis tämän tutkimuksen perusteella ole merkittävä syy negatiivisille viljelytuloksille. Gram-positiivisten kokkien kasvaminen rypäissä voisi kenties johtaa siihen, että viljelytökseen ei satu bakteereja, vaikka niitä olisi kohtalaisen paljon.

On syytä olettaa, että useiden tässä tutkimuksessa tutkittujen näytteiden negatiivinen viljelytulos johtui siitä, että niissä olevien bakteerien kasvu oli syystä tai toisesta estynyt. Bakteerien kasvun estymiseen voivat vaikuttaa monet tekijät. Todennäköisesti yksittäisen negatiivisen viljelytuloksen syynä on useita eri tekijöitä, jotka yhdessä saavat aikaan sen, että bakteerit kuolevat, tai niiden kasvu estyy.

Näytteen säilytys- ja kuljetusajalla ennen viljelyä sekä lämpötilalla kuljetuksen ja säilytyksen aikana on varmasti merkittävä vaikutus bakteerien kunnolle (Hogan ym. 1999; Schukken ym. 1988; Biddle ym. 2004). Tässä tutkimuksessa näytteen käsittely oli

verrattavissa tavanomaiseen näytteiden käsittelyyn, olosuhteet eivät olleet tarkasti kontrolloituja. Säilytys ja kuljetus ovat voineet heikentää bakteereja. Bakteerien kasvua voivat mahdollisesti estää myös näytteenoton yhteydessä näytteen sekaan joutuneet kemikaalit, maidossa olevat bakteerien kasvua rajoittavat tekijät ja lehmän immuunipuolustuksen solut. Fagosyyttien sisällä voi säilyä eläviäkin soluja (Pyörälä 1995), jotka eivät vain kasva viljelyssä.

Ennen näytteenottoa annettu antibioottilääkitys vaikuttaa todennäköisesti niin, että bakteerit eivät kasva utaretulehdusnäytteestä. Mahdollisesti tässäkin tutkimuksessa antibiootit ovat olleet syynä negatiivisille viljelytuloksille joissain tapauksissa.

On siis useita mahdollisia syitä siihen, miksi tutkimuksen kohteena olleissa näytteissä ei todettu mikrobikasvua. Tämän tutkimuksen perusteella voidaan esittää vain arvauksia siitä, mitkä kaikki syyt vaikuttavat negatiivisten viljelytulosten saamiseen. Yksittäisten syiden merkityksen selvittäminen vaatisi myös enemmän tutkimusta. On joka tapauksessa mielenkiintoista, että lähes puolet näytteistä, joissa ei todettu viljelemällä kasvua, sisälsi tavallisimpien utaretulehdusbakteerien DNA:ta. Jos tällaiset tapaukset saataisiin selvitettyä rutiinidiagnostiikassa, siitä olisi hyötyä sekä utaretulehduksen ennaltaehkäisyyn että yksittäisten lehmien hoitojen suunnittelussa.

PCR:ään perustuvalla diagnostiikalla saadaan taudinaiheuttaja selville useissa tapauksissa, joissa viljelytulos on negatiivinen. Tällä hetkellä näytteiden tutkiminen on kuitenkin PCR:llä kalliimpaa kuin viljelyllä. Ainoa rahallinen tappio negatiivisista viljelytuloksista ei toki ole viljelyn hinta. Kun hoitoa ei osata kohdistaa tulehduksen aiheuttajabakteeriin, hoitotulokset kärsivät. Vaarana on myös ylimitoitettu antibioottien käyttö, josta seuraa ylimääräisiä kustannuksia ja resistenttien bakteerikantojen yleistymistä. Tällä hetkellä PCR-menetelmä voisi olla taloudellisesti kannattava ainakin sellaisissa tapauksissa, joissa on syytä epäillä bakteerien kasvun estyvän. Tällaisia voisivat olla esimerkiksi tapaukset, joissa viljelyn tekeminen syystä tai toisesta viivästyisi huomattavasti. PCR:ää voi suositella myös tapauksissa, joissa negatiivisen viljelytuloksen saaminen olisi erityisen turhauttavaa tai tieto aiheuttajabakteerista halutaan saada nopeasti.

## **KIITOKSET**

Suuret kiitokset työni ohjaajille, ELL Heli Simojelle ja ELT Suvi Taposelle vastauksista kysymyksiin, nopeasta kommentoinnista ja kannustavuudesta. Työni johtajalle Prof. Satu Pyörälälle kiitos ohjeista, korjauksista ja kommenteista.

Haluan kiittää kaikkia, jotka ovat osallistuneet tutkimukseen kuuluvien määritysten tekemiseen. Kiitos Finnzymes Oy:lle myös PathoProof<sup>TM</sup> Mastitis PCR Assay-menetelmän esittelystä. Vielä kiitos Kirsi Näkille työni lukemisesta ja kommenteista sekä työni opponoinnista Eija Malinille.

## LÄHDELUETTELO

- Adams DS, Hancock D, Fox L, McDonald JS. Frequency of Reisolation of *Staphylococcus-Aureus* from Multiple Sequential Milk Samples. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992, 201: 575-579.
- Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infection and Immunity* 1980, 28: 893-898.
- Baird SC, Carman J, Dinsmore RP, Walker RL, Collins JK. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999, 11: 432-435.
- Ball HJ, Finlay D, Mackie DP, Greer D, Pollock D, McNair J. Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of an inflammatory response antigen in subclinical mastitic milk samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1991, 29: 1625-1628.
- Bergsson G, Arnfinnsson J, Karlsson SM., Steingrímsson O, Thormar H. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998, 42: 2290-2294.
- Bergsson G, Steingrímsson O, Thormar H. In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999, 43: 2790-2792.
- Biddle MK, Fox LK, Hancock DD, Gaskins CT, Evans, MA. Effects of storage time and thawing methods on the recovery of *Mycoplasma* species in milk samples from cows with intramammary infections. *Journal of Dairy Science* 2004, 87: 933-936.
- Boddie RL, Nickerson SC. Evaluation of two iodophor teat germicides: activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Dairy Science* 1997, 80: 1846-1850.
- Boddie RL, Nickerson SC. Reduction of mastitis caused by experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by use of a quaternary ammonium and halogen-mixture teat dip. *Journal of Dairy Science* 2002, 85: 258-262.
- Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *The Veterinary Record* 2007, 160: 253-257.
- Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1992, 30: 1654-1660.

- Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* 2003, 34: 521-564.
- Cai HY, Bell-Rogers P, Parker L, Prescott JF. Development of a real-time PCR for detection of *Mycoplasma bovis* in bovine milk and lung samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2005, 17: 537-545.
- Dinsmore RP, English PB, Gonzalez RN, Sears PM. Use of Augmented Cultural Techniques in the Diagnosis of the Bacterial Cause of Clinical Bovine Mastitis. *Journal of Dairy Science* 1992, 75: 2706-2712.
- Djabri B, Bareill N, Beaudeau F, Seegers H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary Research* 2002, 33: 335-357.
- Ellison RT 3rd, Giehl TJ. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *The Journal of Clinical Investigation* 1991, 88: 1080-1091.
- Ellison RT 3rd, Giehl TJ, LaForce FM. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infection and Immunity* 1988, 56: 2774-2781.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *Journal of Immunology* 1972, 109: 129-135.
- Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Ost M, Bengtsson B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Veterinary Microbiology* 2008, in press
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, ym. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews* 2006, 19: 165-256.
- EVIRA. Menetelmäohje Evira 3480/1. Utaretulehdusta aiheuttavien mikrobien eristäminen ja tunnistaminen.  
<[http://www.evira.fi/attachments/elaintauti\\_ja\\_elintarviketutkimus/mbi\\_ohjeet/evira3480\\_v1\\_mastiitti.pdf](http://www.evira.fi/attachments/elaintauti_ja_elintarviketutkimus/mbi_ohjeet/evira3480_v1_mastiitti.pdf)> haettu 29.4.2009.
- EVIRA. Eviran julkaisuja 7/2008. Eläintaudit Suomessa 2007.  
<<http://www.evira.fi/uploads/WebShopFiles/1228135726962.pdf>>, haettu 29.4.2009.
- Fox LK, Adams DS. The ability of the enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibody against *Staphylococcus aureus* in milk following experimental intramammary infection. *Journal of Veterinary Medicine: B* 2000, 47: 517-526.
- Ghadersohi A, Coele, RJ, Hirst RG. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology* 1997, 56: 87-98.

Ghadersohi A, Hirst RG, Forbes-Faulkener J, Coelen RJ. Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy in cattle in Australia. *Veterinary Microbiology* 1999, 65: 185-194.

Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno López J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2002, 43: 221-230.

Gillespie, BE, Oliver SP. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science* 2005, 88: 3510-3518.

Godden SM, Jansen JT, Leslie KE, Smart NL, Kelton DF. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. *Canadian Veterinary Journal* 2002, 43: 38-42.

González RN, Wilson DJ. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 2003. 19: 199-221.

Gonzalo C, Martínez JR, Carrledo JA, San Primitivo F. Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. *Journal of Dairy Science* 2003, 86: 138-145.

Green MJ, Bradley AJ, Newton H, Browne WJ. Seasonal variation of bulk milk somatic cell counts in UK dairy herds: investigations of the summer rise. *Preventive Veterinary Medicine* 2006, 74: 293-308.

Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science* 1994, 77: 2103-2112.

Heczko PB, Lütticken R, Hryniewicz W, Neugebauer M, Pulverer G. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* and group A, B, C, and G streptococci to free fatty acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1979, 9: 333-335.

IDF. Suggested interpretation of mastitis terminology. Smith KL (co-ordinator). *International Dairy Federation* 1999, Bulletin no 338:3-26.

Hogan JS, Smith KL. Coliform mastitis. *Veterinary Research* 2003, 34: 507-519.

Hogan JS, Duthie AH, Pankey JW. Fatty acid composition of bovine teat canal keratin. *Journal of Dairy Science* 1986, 69: 2424-2427.

Hogan JS, Pankey JW, Duthie AH. Growth inhibition of mastitis pathogens by long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* 1987, 70: 927-934.

Hogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Growth responses of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids. *Journal of Dairy Science* 1988, 71: 245-249.

Hogan JS, González RN, Harmon RJ, Nickerson SC, Oliver SP, Pankey JW, Smith KL. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. National Mastitis Council, Madison, WI 1999.

Jousimies-Somer H, Pyörälä S, Kanervo A. Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996, 40: 157-160.

Khan MA, Kim CH., Kakoma I, Morin E, Hansen RD, Hurley WL, ym. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. *American Journal of Veterinary Research* 1998, 59: 807-813.

Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrli M Jr, ym. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 2001, 84: 74-83.

Kitchen BJ, Middleton G, Durward IG, Andrews RJ, Salmon MC. Mastitis diagnostic tests to estimate mammary gland epithelial cell damage. *Journal of Dairy Science* 1980, 63: 978-983.

Kitchen BJ, Middleton G, Salmon M. Bovine milk N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *The Journal of Dairy Research* 1978, 45: 15-20.

Koivula M, Pitkälä A, Pyörälä S, Mäntysaari EA. Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. *Acta Agriculturae Scandinavica: A* 2007, 57: 89-96.

Koskinen MT, Holopainen J, Pyörälä S, Bredbacka P, Pitkälä A, Barkema HW, ym. Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 2009, 92: 952-959.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, ym. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006, 27: 95-125.

Kuttila T. Role of Lactoferrin in Treatment of Bovine Mastitis. Helsingin yliopisto, Helsinki 2004.

Legrand D, Ellass E, Pierce A, Mazurier J. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *BioMetals* 2004, 17: 225-229.

Loeffler DA, Creasy MT, Norcross NL, Paape MJ. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of leukocidin toxin from *Staphylococcus aureus* in bovine milk samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1988, 26: 1331-1334.

Makovec JA, Ruegg, PL. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001, *Journal of Dairy Science* 2003, 86: 3466-3472.

Masson PL, Heremans JF, Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1969, 130: 643-658.

Matsushita T, Dinsmore RP, Eberhart RJ, Jones GM, McDonald JS, Sears PM, Adams DS. Performance studies of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Staphylococcus aureus* antibody in bovine milk. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1990, 2: 163-166.

Mattila T. Diagnostic problems with bovine mastitis with special reference to new applications of milk antitrypsin, NAGase and bacterial growth. *Eläinlääketieteellinen korkeakoulu, Helsinki* 1985.

Mattila T, Sandholm M. Antitrypsin and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase as markers of mastitis in a herd of Ayrshire cows. *American Journal of Veterinary Research* 1985, 46: 2453-2456.

Myllys V, Asplund K, Brofeldt E, Hirvelä-Koski V, Honkanen-Buzalsk T, Junttila J, ym. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 – changes in prevalence and antimicrobial resistance. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1998, 39: 119-126.

Nair MK, Joy J, Vasudevan P, Hinckley L, Hoagland TA, Venkitanarayanan KS. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science* 2005, 88: 3488-3495.

Nevala M, Taponen S, Pyörälä S. Naudan kliinisen utaretulehduksen bakteerietiologia – Saaren ambulatoirisen klinikan aineisto vuosilta 2002–2003. *Suomen Eläinlääkärilehti* 2004, 110: 363-369.

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Stryhn H. The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science* 2007, 90: 1704-1715.

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Veenstra W, Berg FE, Stryhn H, Zadoks RN. Somatic cell count during and between milkings. *Journal of Dairy Science* 2007, 90: 3733-3741.

Olde Riekerink RG, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science* 2008, 91: 1366-1377.

Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. *BioMetals* 2004, 17: 189-196.

Østerås O, Sølverød L, Reksen O. Milk culture results in a large Norwegian survey – effects of season, parity, days in milk, resistance, and clustering. *Journal of Dairy Science* 2006, 89: 1010-1023.

Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science* 2001, 84: 1140-1148.



Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001– prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science* 2004, 87: 2433-2441.

Projan SJ, Brown-Skrobot S, Schlievert PM, Vandenesch F, Novick RP. Glycerol monolaurate inhibits the production of beta-lactamase, toxic shock toxin-1, and other staphylococcal exoproteins by interfering with signal transduction. *Journal of Bacteriology* 1994, 176: 4204-4209.

Pyörälä S, Jousimies-Somer H, Mero M. Clinical, bacteriological and therapeutic aspects of bovine mastitis caused by aerobic and anaerobic pathogens. *The British Veterinary Journal* 1992, 148: 54-62.

Pyörälä S. Staphylococcal and streptococcal mastitis. Teoksessa: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S (toim.) *Bovine udder and mastitis*. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 1995.

Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research* 2003, 34: 565-578.

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. Diseases of the mammary gland. Teoksessa: *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. p. Elsevier Limited, New York 2007.

Rainard P. The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary Research* 2003, 34: 647-670.

Rainard P, Riollot C. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research* 2006, 37: 369-400.

Riffon R, Sayasith K., Khalil H, Dubreuil P, Drolet M, Lagace J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2001, 39: 2584-2589.

Ringler DJ. Inflammation and repair. Teoksessa: Jones TC, Hunt RD, King NW (toim.) *Veterinary pathology*. 6. p. Williams & Wilkins, Baltimore 1997.

Ruzin A, Novick RP. Glycerol monolaurate inhibits induction of vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology* 1998, 180: 182-185.

Saini SS, Allore B, Jacobs RM, Kaushik A. Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies. *European Journal of Immunology* 1999, 29: 2420-2426.

Sampimon O, Barkema HW, Berends I, Sol J, Lam T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. *The Journal of Dairy Research* 2009, 1-8.

Sandholm M, Pyörälä S. Coliform mastitis. Teoksessa: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S (toim.) Bovine udder and mastitis. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 1995.

Sandholm M. Detection of inflammatory changes in milk. Teoksessa: Sandholm M, Honkanen-Buzalski T, Kaartinen L, Pyörälä S (toim.) Bovine udder and mastitis. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä 1995.

Schepers AJ, Lam TJ, Schukken YH, Wilmink JB, Hanekamp WJ. Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. Journal of Dairy Science 1997, 80: 1833-1840.

Schoonderwoerd M, Lewis IM, Scholten JA. Acute gangrenous mastitis due to *Clostridium perfringens* type A and *Escherichia coli* in a cow. The Canadian Veterinary Journal 1990, 31: 523-524.

Schukken YH, Grommers FJ, Smit JA, Vandegheer D, Brand A. Effect of freezing on bacteriologic culturing of mastitis milk samples. Journal of Dairy Science 1989, 72: 1900-1906.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, Gonzalez RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Veterinary Research 2003, 34: 579-596.

Sears PM, Smith BS, English PB, Herer PS, Gonzalez RN. Shedding Pattern of *Staphylococcus-Aureus* from Bovine Intramammary Infections. Journal of Dairy Science 1990, 73: 2785-2789.

Sears PM, Wilson DJ, Gonzalez RN, Hancock DD. Microbiological results from milk samples obtained premilking and postmilking for the diagnosis of bovine intramammary infections. Journal of Dairy Science 1991, 74: 4183-4188.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Veterinary Research 2003, 34: 475-491.

Skrzypek R, Wójtowski J, Fahr RD. Factors affecting somatic cell count in cow bulk tank milk – a case study from Poland. Journal of Veterinary Medicine A 2004, 51: 127-131.

Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. Journal of Dairy Science 1985, 68: 1531-1553.

Sol J, Sampimon OC, Hartman E, Barkema HW. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. Veterinary Microbiology 2002, 85: 241-249.

Songer JG, Post KW. Veterinary Microbiology. Elsevier Saunders, St. Louis, Mo 2005.

Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science* 1997, 80: 1851-1865.

Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune Components of Bovine Colostrum and Milk. *Journal of Animal Science* 2009, 87: 3-9.

Sun CQ, O'Connor CJ, Turner SJ, Lewis GD, Stanley RA, Robertson AM. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. *Chemico-Biological Interactions* 1998, 113: 117-131.

Tizard IR. *Veterinary Immunology, an introduction*. 8. p. Saunders Elsevier, St Louis, Mo 2009.

van der Burgt G, Main W, Ayling R. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma bovis*. *The Veterinary Record* 2008, 163: 666.

Villanueva MR, Tyler JW, Thurmond MC. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1991, 198: 1398-1400.

Weinberg ED. Iron and infection. *Microbiological Reviews* 1978, 42: 45-66.

Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 1990, 18: 7213-7218.

Willet NP, Morse GE. Long-chain fatty acid inhibition of growth of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium. *Journal of Bacteriology* 1966, 91: 2245-2250.

Zorah KT, Daniel RC, Frost AJ. Detection of bacterial antigens in milk samples from clinical cases of bovine mastitis in which culture is negative. *Veterinary Record* 1993, 132: 208-210.

## LIITE

### Ohjeet karjanomistajalle puhtaan maitonäytteen ottamiseksi bakteriologista tutkimusta varten

Kädet pestään huolellisesti. Neljänneksistä lypsetään alkusuihkeet, joiden tarkoituksena on huuhtoa vedinaukosta pois näytteen tulosta sekoittavat bakteerit.

Jos utare on lantainen, se pestään vedellä ja kuivataan. Potkivalle lehmälle on parasta käyttää potkunestäjää näytettä otettaessa. Likaisella hännällä huiskiminen näytteenoton aikana olisi myös estettävä. Vedin puhdistetaan desinfektioiuoksella kastetulla reilunkokoisella pumpulitukolla tai kertakäyttöisellä vetimien desinfektioiinalla. Tuppo ei saa olla tippuvan märkä, vaan sopivan kostea. Vetimestä otetaan tukeva ote ja vedinaukkoa hangataan kolmella erillisellä tupolla tai kääntäen samasta tuposta puhdas pinta. Puhdistaminen keskitetään nimenomaan vedinkanavan suuhun. Puhdistamiseen käytetään aikaa vähintään 5 sekuntia yhtä tuppoa kohti, eli voi laskea hitaasti viiteen joka tupon tai puhtaan pinnan kohdalla. Jos vetimen pää on rupinen, syyläinen tai rikki, kunnollista näytettä on vaikea saada ja puhdistamiseen on käytettävä enemmän aikaa.

Näyteputken korkki avataan ja sitä pidetään kädessä niin, ettei siihen pääse varisemaan likaa (ks. kuva). Korkin sisäosaan ei saa koskea käsin, vaan korkkia pidetään esim. kuvan osoittamalla tavalla alaspäin. Maitosuihkeet lypsetään putkeen niin, että putki on lähes vaakatasossa; näin vältetään lian variseminen putkeen. Näytteeksi riittää muutama millilitra eli noin 5 sentin kerros putken pohjalle, ellei muita ohjeita anneta. Korkki suljetaan heti ja putki lähetetään viljeltäväksi tai laitetaan pakkaseen odottamaan myöhempää tutkimista.

